



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

척수 운동신경 발달 중 ISL1-LHX3
복합체의 표적 유전자 기능 규명

**Molecular Mechanisms of ISL1-LHX3 Complex
Target Genes in Spinal Motor Neuron Development**

2019년 8월

서울대학교 대학원

약학과 약물학전공

남 희 진

척수 운동신경 발달 중 ISL1-LHX3

복합체의 표적 유전자 기능 규명

**Molecular Mechanisms of ISL1-LHX3 Complex
Target Genes in Spinal Motor Neuron Development**

지도교수 이 승 희

이 논문을 약학박사학위논문으로 제출함

2019년 8월

서울대학교 대학원
약학과 약물학전공
남 희 진

남희진의 박사학위논문을 인준함

2019년 8월

위 원 장 강 건 욱 (인)

부위원장 차 혁 진 (인)

위 원 송 미 령 (인)

위 원 허 은 미 (인)

위 원 이 승 희 (인)

국문초록

척수 운동신경 발달 중 ISL1-LHX3 복합체의 표적 유전자 기능 규명

남 희 진

약물학전공

약학대학

서울대학교 대학원

손을 움켜 쥐거나 걷기와 같은 다양한 근육의 움직임은 뇌와 척수로
구성되는 중추 신경계 (Central Nervous System)에서 운동 신경이 axon을
돌출하여 표적 하는 여러 근육들을 자극 시키는 조직적인 체계를 통해
이루어진다. 각 운동 신경은 embryo의 발달 과정 중에 다양한 전사
인자들의 조합으로 다양성을 얻게 된다. spinal cord의 초기 발달 단계의
floor plate에서 분비 되는 Sonic hedgehog (Shh)는 spinal cord의 dorsoventral

axis를 따라 농도 구배를 이루며 ventral neural tube의 progenitor domain 형성에 기여한다. 이때 운동 신경 세포는 운동 신경의 progenitor (pMN)에서 유래하게 된다. pMN에서 발현되는 basic helix-loop-helix (bHLH) 전사 인자, Olig2는 pMN의 최종 세포 분열 과정에서 ISL1과 LHX3의 발현을 유도하게 되고 이 두 단백질이 모여서 만들어진 ISL1-LHX3 complex는 운동 신경에 정체성을 부여하는 관련된 유전자의 hexamer response element (HxRE)를 인식하여 해당 유전자의 전사 조절에 관여한다. 본 연구는 다양한 유전자 후보들 중, STAM1과 ARHGAP36가 운동 신경의 분화와 성숙에 어떻게 기여하는지 그 기능을 알아보고자 했다.

STAM1은 세포내이입에 관여하는 단백질로서 HRS와 함께 endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT-0) 복합체를 형성, 다소포체 생성 경로와 세포질 분열에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. STAM1의 enhancer에 ISL1-LHX3 complex가 결합하여 전사가 조절되고 spinal cord 내 운동 신경에서 특이적으로 발현됨을 밝혔다. ESCRT-0에 의해 인식되는 CXCR4는 운동 신경의 발달 과정 중 axon이 spinal cord의 ventral exit point를 찾아 나감으로써, 표적 하는 근육에 도달하는데 중요하다고 알려져 있다. Chick embryo의 spinal cord 운동 신경에서 STAM1, HRS와 함께 ESCRT-0의 표적 단백질인 CXCR4도 발현되고 있음과, 이들 사이의 상호작용이 존재함을 보였다. Chick embryo의 spinal cord에서 STAM1을 knockdown 시켰을 때, CXCR4의 단백질 양에 영향을

주고, 그로 인해 ventral exit point를 찾지 못한 운동 신경의 axon이 dorsal 방향으로 뻗어가는 현상을 관찰할 수 있었다. 마찬가지로 STAM1 혹은 CXCR4를 과발현 시켰을 때도 이런 유사한 phenotype을 보였다. 본 연구는 위의 결과들을 토대로 ISL1-LHX3 complex의 표적 유전자인 STAM1은 적절한 CXCR4의 양을 유지시켜 운동 신경이 올바른 exit point를 통해 spinal cord 밖으로 나갈 수 있게 유도함을 밝혔다.

또 다른 표적 유전자인 ARHGAP36도 enhancer region에 존재하는 hexamer response element (HxRE)에 ISL1-LHX3가 결합하여 Arhgap36의 전사를 조절함을 보였다. ARHGAP36는 spinal cord 내 운동 신경에서만 제한적으로 발현되고, 특히 Lateral Motor Column (LMC)에 특이적으로 발현하고 있음을 확인했다. 기존의 연구 결과에 따르면 ARHGAP36는 Shh pathway의 하위 인자로 Shh 신호 전달을 매개하는 역할을 한다고 알려져 있으나 postmitotic 운동 신경에서 ARHGAP36와 Shh 신호의 중요성은 잘 알려지지 않았다. Shh 혹은 Arhgap36 knockout mouse model은 정상적인 수준의 LMC를 유지하지 못하고 chick embryo spinal cord에서 ARHGAP36의 과발현은 LMC 운동 신경의 증가를 유도함을 보였다. 또한 Shh pathway의 positive regulator인 AKT가 ARHGAP36의 인산화를 유도함으로써 protein stability를 증가시키고 결과적으로 ARHGAP36는 PKA의 kinase activity를 억제시켜 Shh 활성을 매개함을 발견했다. 본 연구는 ISL1-LHX3 complex에 의해 발현이 조절된 ARHGAP36가 LMC에

존재하는 Shh-AKT 신호를 통해 protein stability가 증가되고 LMC 운동 신경이 유지되는데 필요한 요소임을 밝혔다.

종합하면, ISL1-LHX3 complex의 표적 유전자들인 STAM1과 ARHGAP36는 운동 신경의 분화와 성숙에 기여함으로써 운동 신경들이 갖는 공통적인 특성을 부여함과 동시에 각 운동 신경만의 다양성을 생성하는데 중요하다는 것을 보여준다.

주요어: 척수 운동 신경, ISL1-LHX3 complex, STAM1, ARHGAP36, axon projection, LMC

학번: 2013-21586

목차

국문초록	i
목차	v
List of Tables	viii
List of Abbreviations	ix
List of Figures	xii
서론	1
연구재료 및 방법	15
1. 유전자 변형 동물 제작 및 분석	15
2. 세포 배양	16
3. 형질 감염	16
4. Plasmids	16
5. In ovo electroporation	18
6. 배아 줄기 세포 분화	19
7. In situ hybridization	19
8. 형광 염색 법	20
9. Western blot 과 Immunoprecipitation	21

10. RNA 추출 및 실시간 중합효소연쇄반응 (qPCR)	24
11. Reporter assay	25
12. Primary motor neurons 배양	25
13. 통계 분석	26
결과	27
STAM1 의 기능	27
1. Stam1 유전자 내 ISL1-LHX3 complex 의 결합 위치 및 전사 유도 확인	27
2. Embryo 의 spinal cord 운동 신경에서 STAM1 의 발현 양상	31
3. STAM1 의 ESCRT-0 복합체 형성을 통한 CXCR4 단백질 양 조절	35
4. STAM1 과 CXCR4 의 과발현 및 발현 감소로 인한 운동신경 axon 의 방향성 상실	39
ARHGAP36 의 기능	44
1. Isl1-Lhx3 complex 의 표적 유전자인 Arhgap36 의 spinal cord 내 전사 조절	44
2. Embryo spinal cord 의 운동 신경 중 Lateral Motor Column 에서 발현되는 ARHGAP36.....	48

3. Brachial level 의 LMC 에서 발현되어 FoxP1 단백질 발현을 유지시키는 Shh.....	55
4. Spinal cord 에서 Shh signal 을 중재하고 활성화 시키는 ARHGAP36	62
5. AKT 를 통한 ARHGAP36 의 단백질 안정화	71
6. LMC 의 발달에 중요한 인자인 AKT 와 Shh	77
7. ARHGAP36 의 인산화를 유도하는 AKT	80
8. PKA 의 kinase activity 를 억제 시키는 ARHGAP36	85
고찰	91
참고문헌	98
Abstract.....	104

List of Tables

Table 1) Primers used for enhancer and shRNAs	18
Table 2) Primers used for probe designing	20
Table 3) List of antibodies used for IP, western blot, IHC	22
Table 4) Primers used in qPCR	24

List of Abbreviations

AKT	protein kinase B
ARHGAP36	rho-GTPase activating protein 36
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bHLH	basic helix-loop-helix
CA	constitutively active
Cas9	CRISPR associated protein 9
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CHX	cycloheximide
CREB	CRE binding protein
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTRL	control
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DN	dominant negative
DOX	doxycycline
EEA1	early endosomal antigen 1
ESCRT-0	endosomal sorting complexes required for transport
FGF	fibroblast growth factor
FoxP1	forkhead box protein P1
GDF11	growth differentiation factor 11
GLI	glioma-associated oncogene
GPCR	G-protein coupled receptor

HH	Hamburger and Hamilton
HMC	hypaxial motor column
Hox	homeobox
HRS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HxRE	hexamer response element
iAKT	AKT1/2 kinase inhibitor
ISL1	islet1
KO	knockout
LHX3	LIM homeobox 3
LMC	lateral motor column
MMC	medial motor column
NBT	nitro blue tetrazolium
NLI	nuclear LIM interactor
OLIG2	oligodendrocyte transcription factor
Pbx	pre-B-cell leukemia transcription factor
PCR	polymerase chain reaction
PGC	preganglionic column
PKA	protien kinase A
PURM	purmorphamine
qPCR	quantitative PCR
RA	retinoic acid
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RT-PCR	real time PCR

RUNX1	runt-related transcription factor 1
SAG	smoothened agonist
Sca	scapulohumeralis posterior
SDF1	stromal cell-derived factor 1
sgRNA	single guide RNA
SHH	sonic hedgehog
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
STAM1	signal transducing adaptor molecule 1
TGF- β	transforming growth factor beta
VACht	vesicular acetylcholine transporter
vMN	ventral motor neuron
WT	wildtype

List of Figures

Figure 1. Two aspects of the spinal cord development	4
Figure 2. ISL1-LHX3 complex, the master regulator of motor neurons	7
Figure 3. The spinal cord development in rostrocaudal axis	11
Figure 4. ISL1-LHX3 complex regulates the transcription of Stam1 through HxRE	30
Figure 5. STAM1 expression pattern in spinal motor neurons	34
Figure 6. Regulating CXCR4 protein levels through ESCRT-0 machinery.....	38
Figure 7. Expression levels of STAM1 and CXCR4 are essential in finding ventral exit points of vMN.....	43
Figure 8. ISL1-LHX3 complex activates transcription of Arhgap36.....	47
Figure 9. The temporal and spatial expression patterns of ARHGAP36	53
Figure 10. The expression patterns of Shh in the spinal motor neurons and their functions	60
Figure 11. Overexpression of ARHGAP36 in spinal motor neurons.....	66
Figure 12. Arhgap36 knockout embryos show defects in maintaining LMC neurons.....	69
Figure 13. AKT stabilizes ARHGAP36	75
Figure 14. AKT expressed in spinal motor neurons contributes to LMC specification.....	79
Figure 15. Activated AKT phosphorylates ARHGAP36 and induces stabilization	84

Figure 16. ARHGAP36 inhibits PKA kinase activity	89
Figure 17. Proposed model of STAM1 and ARHGAP36	90

서론

우리가 자유롭고 섬세하게 신체를 움직이기 위해서는 운동 신경의 axon 이 뇌와 척수를 포함하는 중추신경계 (Central Nervous System, CNS)로부터 뻗어 나와 표적 하는 근육이나 장기에 도달하여 적절한 신호 전달 물질들을 통해 자극 할 수 있어야 한다. 이러한 복잡한 네트워크를 형성하기 위해서 운동 신경이 1) 지정된 위치에서 해당하는 정체성을 갖도록 분화된 후, 2) 올바른 표적 위치에 도달하는 성숙 과정을 거쳐야 한다. 하지만 spinal cord 운동 신경의 중요성과 다양성에 비해 그 분화와 성숙 과정에 대한 기작은 아직 밝혀야 할 부분이 많다.

중추신경계의 형성은 embryonic stage의 ectoderm에서 시작된다. Ectoderm 은 neural plate를 형성하고 primary neurulation이 시작된다. Neural plate가 계곡 모양으로 굽어지면서 neural crest가 상승하여 neural fold 서로 맞닿게 되고 결과적으로 neural tube가 형성된다. Neural tube의 rostral 부분은 후에 뇌가 되고, caudal 부분은 spinal cord가 된다 (Tanabe & Jessell, 1996)(Figure 1A). 이렇게 형성된 neural tube는 크게 두 개의 축으로 나뉘어서 발달하게 된다. 첫째는 notochord와 floor plate에서 발현되는 sonic hedgehog (Shh)와 epidermis와 roof plate에서 발현되는 transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily의 농도 구배에 따라 형성되는 dorsoventral axis (J Briscoe et al.,

1999; Davis-Dusenbery et al., 2014; Liem Jr et al., 1995)(Figure 1B), 두번째는 fibroblast growth factor (FGF), retinoic acid (RA), growth differentiation factor 11 (GDF11), transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily의 조합으로 형성되는 rostral-caudal axis 이다 (Davis-Dusenbery et al., 2014; Dessaud et al., 2008; Shirasaki & Pfaff, 2002). 즉, 운동 신경은 spinal cord 상에서의 좌표에 따라 올바른 신호 또는 전사 인자들의 조합에 의존하여 정체성을 얻게 되므로 운동 신경의 발생 과정 또한 앞서 언급한 두 개의 축을 중심으로 살펴볼 수 있다.

우선, Shh는 spinal cord의 notochord와 floor plate에서 발현되는 morphogen 으로서 spinal cord의 dorsoventral axis를 따라 농도 구배를 이루게 된다 (Martí & Bovolenta, 2002; Martí et al., 1995; Zeng et al., 2001). Shh의 발현 정도에 따라 ventral domain에서는 GLI1이 전사 활성을 유도하는 단백질로 작용하며 Shh 신호를 전달하고, GLI3는 spinal cord의 중간 부분부터 dorsal region까지 발현되어 Shh의 하위 표적 유전자들의 전사를 억제한다고 알려져 있다 (Jacob & Briscoe, 2003). Shh에 의해 유도되는 GLI activator (ventral domain)와 repressor (dorsal domain)의 전사 활동은 결과적으로 다양한 basic helix-loop-helix (bHLH) 전사 인자들의 발현을 촉진시키게 된다. Class II로 분류되는 Shh에 의해 억제되는 인자 (Pax6, Irx3, Dbx2, etc.)들과 Class I으로 분류되는 Shh에 의해 활성화 되는 인자 (Nkx2.2, Olig2, Nkx6.1, etc.)들은 상호간의 cross-repressive interaction을 통해 ventral spinal cord를 5

종류의 progenitor domain (p0, p1, p2, pMN, p3)으로 세분화 시킨다. 여기서 발현되는 전사 인자들 중, pMN의 경우 OLIG2, PAX6, NKX6 단백질 및 NKX2.2에 의해 경계가 정해진다고 알려져 있다 (Novitch et al., 2001; Vallstedt et al., 2001).

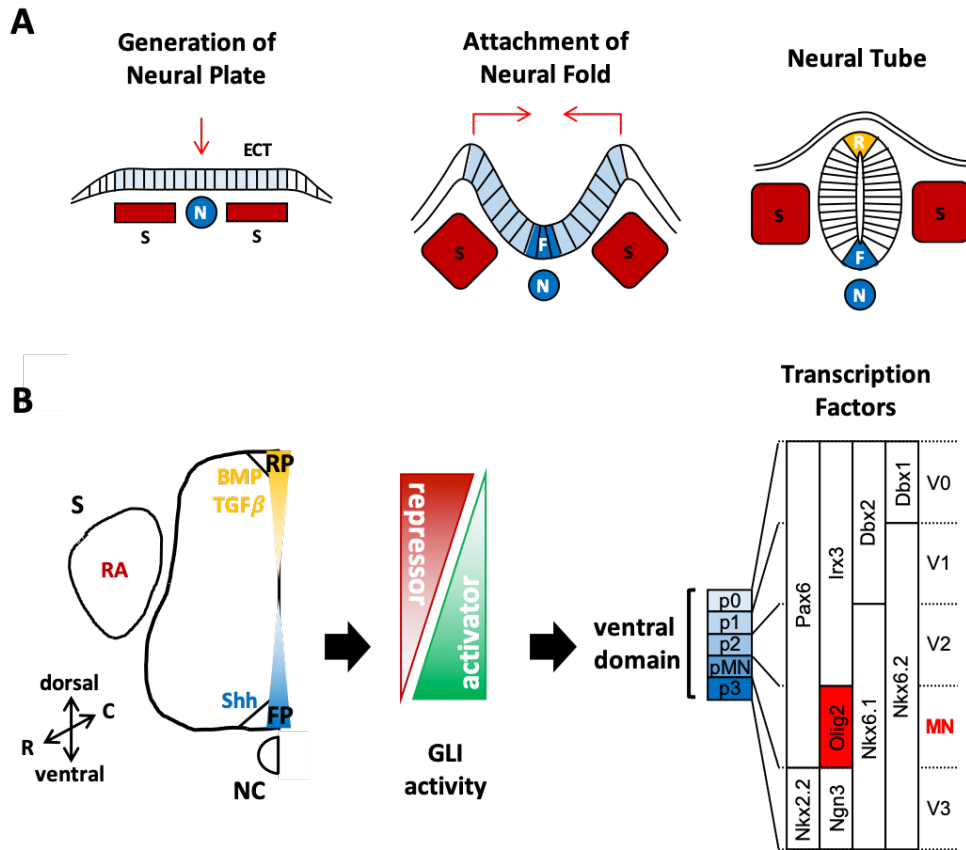


Figure 1. Two aspects of the spinal cord development

(A) Illustration of how neural tube is formed from neural plate. ECT: ectoderm, N: notochord, S: somites, F: floor plate, R: roof plate (modified from Tanabe & Jessell, 1996). (B) Illustration of how dorsoventral axis of the developing spinal cord are generated and how Shh is capable of specifying ventral domain (modified from Davis-Dusenbery et al., 2014).

pMN에서 발현되는 OLIG2는 progenitor cell이 proliferation을 유지 하는데 기여할 뿐만 아니라 신경으로의 분화를 유도하는 NGN2의 발현을 촉진시킨다 (S.-K. Lee et al., 2005; Ma et al., 2008). OLIG2와는 반대의 역할을 하는 NGN2의 단백질 양이 OLIG2보다 증가하게 되면 progenitor cell들은 세포 분열을 멈추고 신경 세포로의 분화를 시작하게 된다. Post-mitotic 운동 신경으로 성숙해지면서 OLIG2는 Islet1 (ISL1)과 LIM homeobox 3 (LHX3) homeodomain 전사 인자의 발현을 유도하게 된다. LHX3는 nuclear LIM interactor (NLI)와 직접 결합하여 인접해 있는 V2 interneuron과 운동 신경의 발달에 관여하는데, 이 두 신경의 차이는 ISL1의 유무에 있다. ISL1은 LHX3와 달리 운동 신경에서만 발현이 되고 ISL1-NLI와의 결합력이 LHX3-NLI 보다 강하여 운동 신경과 관련된 유전자의 전사를 조절할 수 있게 된다 (Song et al., 2009; Thaler et al., 2002). 즉, ISL1, LHX3, NLI가 각각 2 개씩 모여서 운동 신경 복합체 (MN-hexamer 또는 ISL1-LHX3 complex)를 이루며 운동 신경이 운동 신경만의 특징을 갖게 되는데 기여한다 (Arber et al., 1999; Pfaff et al., 1996)(Figure 2A and 2B).

선행 연구 결과에 따르면 ISL1-LHX3 complex는 hexamer response element (HxRE)를 인식하고 그 위치에 결합하여 운동 신경에서 표적 유전자들의 발현을 조절한다. ChIP-seq 데이터를 통해 ISL1-LHX3 complex가 모집되는 HxRE를 가진 후보 유전자들을 밝혔다. 예를 들어, ISL1-LHX3 complex는 cholinergic 유전자와 운동 신경 axon의 방향성을 지정과 관련된 유전자의

전사는 촉진시키는 반면, progenitor cell이나 interneuron과 관련된 유전자의 전사는 억제한다 (S. Lee et al., 2012).

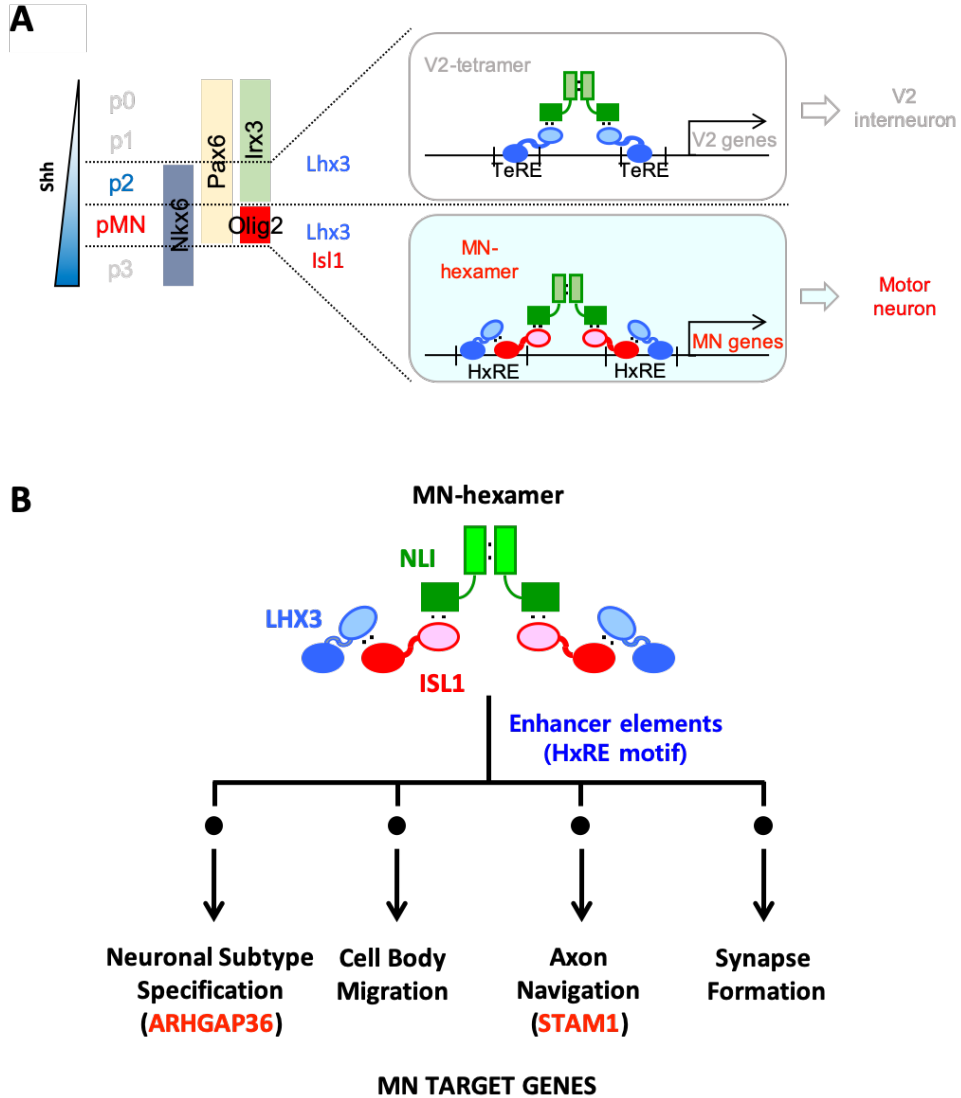


Figure 2. ISL1-LHX3 complex, the master regulator of motor neurons

(A) Illustration showing graded concentration of Shh brings about 5 progenitor domains in the ventral spinal cord. OLIG2 is expressed in pMN and induces ISL1 and LHX3 expression as cell cycle exit occurs. These two factors form a complex called MN-hexamer (or ISL1-LHX3 complex) which then binds to HxRE of MN-

related genes (modified from S. Lee et al., 2008). (B) ISL1-LHX3 complex drives the transcription of various genes that can define motor neurons. *Stam1* and *Arhgap36* are also the candidate targets of MN-hexamer (S. Lee et al., 2012).

운동 신경의 분화에 중요한 역할을 하는 두 번째 요인은 Hox 단백질 계열로, 운동 신경을 특정 subtype으로 세분화 시키는 단계를 조절한다고 알려져 있다. Hox 계열들의 발현 양상은 앞서 언급한 spinal cord의 rostrocaudal axis을 따라 외부 신호 (FGF, RA, TGF- β)에 의해 규제된다. 이러한 신호들은 여러 Hox 계열들이 해당하는 spinal cord의 다른 위치에 존재하도록 하며, 이는 구역 의존적인 세분화에 기여한다 (Dasen et al., 2003; Liu et al., 2001)(Figure 3A). 다시 말해, 운동 신경은 spinal cord 상의 위치에 따라 column으로 나뉘지고, 후에 이들이 더 세분화 되어 division, pool로 구분되어, 각각 다른 근육들을 표적 할 수 있게 된다.

첫번째 기준인 column에 의해 Hox6 단백질은 brachial의 lateral motor column (LMC), Hox9 단백질은 thoracic의 preganglionic column (PGC)과 hypaxial motor column (HMC), Hox10 단백질은 lumbar의 LMC, 마지막으로 spinal cord의 rostrocaudal axis의 위치에 상관 없이 존재하는 medial motor column (MMC) 신경의 발생을 돕는다 (Dasen et al., 2003; Rousso et al., 2008). 두 번째 기준인 division에 의해서 LMC는 limb mesenchyme에서 1) ventrally projecting axon의 근원이 되는 운동 신경으로 구성된 medial division (LMCm)과 2) dorsally projecting axon을 지닌 운동 신경으로 구성된 later division (LMCl)으로 나뉜다. 마지막 기준인 pool은 앞서 나뉜 LMC를 더욱 세분화 시켜 각 운동 신경들이 limb에 존재하는 근육을 정

확하게 표적 할 수 있게 해준다. 특히 팔과 다리는 많은 특징을 공유하지만, 각기 다른 Hox 계열의 발현에 의해 생성되는 독특한 pool을 통해 운동 신경 - 근육 연계성을 갖게 된다 (Dasen & Jessell, 2009)(Figure 3B).

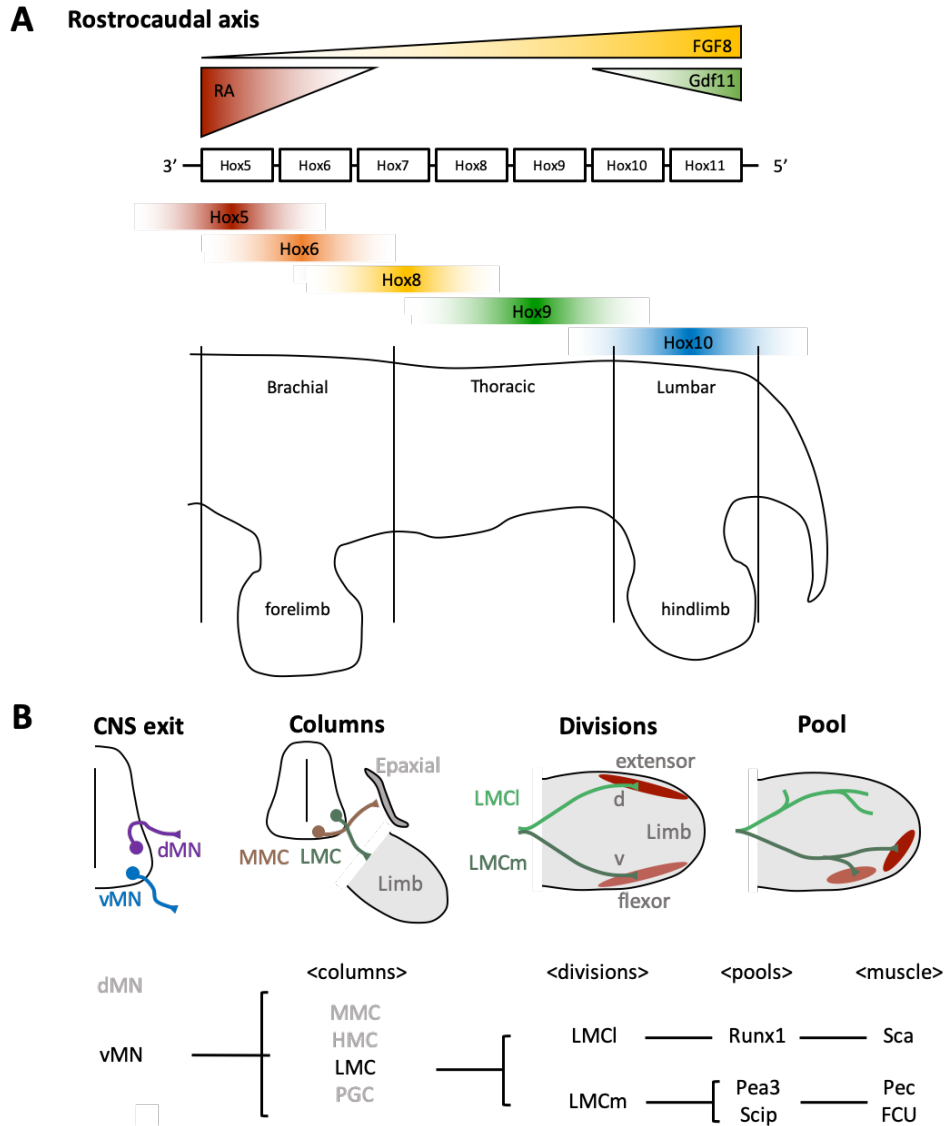


Figure 3. The spinal cord development in rostrocaudal axis

(A) Illustration of how FGF8, GDF11, and RA can specify rostrocaudal axis via Hox family (modified from Dasen & Jessell, 2009). (B) Specification of motor neuron identity by columns, divisions, and pool (modified from Stifani, 2014).

연구 결과에 따르면, FoxP1, 단일 요소에 의해 Hox 단백질과 운동 신경 사이의 다양성과 연결성이 제어된다고 보고 된 바 있다 (Dasen et al., 2008). Hox 계열의 발현 양상을 FoxP1의 발현 수준의 차이로 변환 시켜 spinal cord의 위치에 따라 운동 신경 세포의 다양성을 형성하는데 기여한다. FoxP1의 발현은 팔다리 근육을 표적 하는 brachial과 lumbar level의 LMC 신경에서 특히 강하게 나타난다. 반면 thoracic level의 PGC 신경에서는 낮은 강도로 발현되어 있는 FoxP1이 존재한다. 다른 척추 동물들과의 전사 시스템 비교와 FoxP1 돌연변이 mouse를 분석함으로써 (Dasen et al., 2008), 5 개의 운동 신경 column 모두 LHX3 단독 요소에 의해 MMC의 특징을 가진 동일한 ancestor 운동 신경에서 시작함을 밝혔다. 그 다음, HMC 신경은 MMC 신경이 소멸하면서 LHX3를 발현하지 않는 운동 신경의 생성에 의해 형성된다. 또한 LHX3 negative 조건 하에서 Hox9 단백질의 발현은 thoracic PGC 신경을, Hox6/10 단백질은 LMC 신경의 형성을 유도한다.

분화가 완료된 운동 신경의 axon은 특정 ventral exit point를 통해 spinal cord 밖으로 나와 일종의 묶음 형태로 표적 하는 근육을 향해 뻗어나간다. 기존의 연구 결과에 따르면 척추 내 전사 인자들이 각 운동 신경의 근원과 정체성에 따라 정해진 출구 지점으로 axon projection을 유도하는데 필요하다고 한다 (Guthrie & Lumsden, 1992). 그 중 하나는 pMN에서 유

래한 PAX6, LHX3, LHX4를 발현하는 ventral motor neuron (v-MN)인데 이 운동 신경은 caudal hindbrain과 spinal cord에서 형성되어 ventral exit point를 통해 axon을 내보내는 특징을 가지고 있다 (Sharma et al., 1998). 특히 G protein-coupled receptor (GPCR)의 하나인 CXCR4와 그의 ligand인 SDF1 사이의 작용은 v-MN axon으로 하여금 ventral exit point에 도달하게 하는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Lieberam et al., 2005).

이렇게 두 개의 축을 기준으로 발생하는 과정에서 각 운동 신경은 정확한 시점과 위치에 다양한 요소들의 영향을 받아 정의된다. 본 연구는 운동 신경의 발생 과정에서 ISL1-LHX3 complex에 의해 전자가 촉진되는 표적 유전자 후보들 중 Stam1과 Arhgap36가 운동 신경을 정의하는 과정에서 어떤 역할을 하는지 규명한 것에 의의가 있다 (Figure 2B).

STAM1과 HRS가 1:1로 결합하여 만들어지는 ESCRT-0는 multivesicular body (MVB) 생성에 중요한 복합체로 (Schmidt & Teis, 2012), 막 단백질에 부착되어 있는 ubiquitin을 인식하고 endosome 형성을 유도하여 단백질의 분해를 시작한다 (Bache et al., 2003; Kojima et al., 2014; Mizuno et al., 2004). SDF1에 의해 CXCR4가 활성화 되면 ubiquitin과의 결합이 가속화 된다. 여기서 ESCRT-0는 CXCR4의 endocytosis를 통해 lysosome 분류를 유도하게 된다 (Kennedy & Marchese, 2015). 위에서 언급했듯이 v-MN이 ventral exit point를 찾는데 CXCR4와 SDF1의 작용이 중요하다고 알려져 있다.

따라서 본 연구는 운동 신경에서 ISL1-LHX3 complex의 표적 유전자인 Stam1이 CXCR4의 양을 조절함으로써 v-MN의 axon projection에 참여할 것을 제안했다.

ARHGAP36는 RhoA를 특이적으로 표적 하는 Rho GTPase의 활성을 증진시키는 단백질인 ARHGAP6과 구조적 유사성을 보이지만 기능적인 면에서는 차이를 보인다고 알려져 있다 (Rack et al., 2014). 본 연구는 ISL1-LHX3 complex의 표적 유전자인 Arhgap36가 하위 인자로 포함되어 있는 Shh 신호 전달이 progenitor domain의 경계 설정 이외에도 운동 신경의 column 형성과 같은 또 다른 발생 단계에 관여함을 보였다. 또한 ARHGAP36가 Shh 신호를 전달하는 과정에서 AKT에 의해 조절됨 (Riobó et al., 2006)과 동시에 PKA kinase activity를 억제 시킴으로써 (Eccles et al., 2016) 반대되는 역할을 하는 두 인자 사이의 관계 연결시키고 결과적으로 brachial level의 LMC 신경에서 FoxP1의 발현 유지에 기여함을 보였다.

연구재료 및 방법

1. 유전자 변형 동물 제작 및 분석

Arhgap36 knockout mouse는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 만들어졌다. sgRNA는 Arhgap36의 2번째 exon을 표적 하도록 디자인 했다 (GACTGCTTACCACGAACTCGTGG, ToolGEN). Cas9 단백질과 sgRNA는 단일 세포 배아에 주입되었다 (한국생명공학연구원). 유전자형 확인을 위해서 mouse의 꼬리를 이용하여 genomic DNA를 추출, 다음 primer를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다.

WT forward primer: TGCTTACCACGAACTCGTGG

KO forward primer: TGCTTACCACGAACCAG

공통 reverse primer: CCGTTTCTTCACCTGTCCTC

본론에 명시된 바에 따라 해당하는 embryo stage에 4 도의 phosphate buffered saline (PBS)에서 embryo를 적출했고, 4 % paraformaldehyde (PFA)에서 2 시간 이상 고정시켰다. OCT를 이용해서 급속 냉각 시킨 embryo 조직은 실험에 따라 12-18 um로 동결 절단 했다.

2. 세포 배양

P19 세포는 10 % fetal bovine serum (FBS)와 1 % 항생제 (페니실린과 스트렙토마이신)를 함유한 alpha MEM 배지에서, HEK293T와 HEK293 세포는 10 % FBS와 1 % 항생제를 함유한 DMEM에서, NIH3T3 세포는 10 % bovine calf serum (BCS)와 1 % 항생제를 함유한 DMEM 배지를 사용하였고, 37 도, 5 % 이산화탄소의 조건에서 배양했다.

3. 형질 감염

세포에 따라 다른 형질 감염 방법을 사용하였다. P19 세포와 NIH3T3 세포는 Lipofectamine2000 (Invitrogen)을, HEK293 세포는 Superfect (Qiagen)를, HEK293T 세포는 calcium phosphate를 사용하여 형질 감염을 유도, 48 시간 뒤에 분석하였다.

4. Plasmids

Rat Isl1, mouse Lhx3와 LacZ 유전자는 HA와 Myc으로 표지 하여 포유류에서 발현 시킬 수 있는 pCS2 또는 pcDNA3 vector에 cloning 했다 (S.-K. Lee & Pfaff, 2003; S. Lee et al., 2012; Thaler et al., 2002). pcDNA3-V5-His vector에 cloning 되어 있는 mouse stam1 유전자는 Kazuo Sugamura 박사 (Endo et al., 2000)가, HA로 표지 되어 있는 CXCR4는 Adriano Marchese

박사 (Malik & Marchese, 2010)가, Myc으로 표지 되어 있는 HRS는 Rakesh Kumar 박사 (Rayala et al., 2006)가 제공 했다. SE1-GFP (Song et al., 2006)는 운동 신경 세포의 축삭을 GFP로 표지 하기 위해 사용했다. Stam1의 hexamer response element (P3)는 5 copy로, Arhgap36 enhancer는 2 copy로 TK-LUC 및 TATA-GFP vector에 cloning 하여 reporter assay에 사용하였다. Chick Stam1을 특이적으로 knockdown 시킨 siRNA는 Integrated DNA Technologies (IDT)를 통해서 제작 되었고 siRNA 대조군 (sc-44230)은 Santa Cruz Biotechnology 에서 얻었다. Chick Shh를 특이적으로 knockdown 시킨 short hairpin RNA (shRNA)는 EFU6-300 vector에 cloning 하여 chick embryo에 주입시켰다. HA로 표지 한 mouse Arhgap36 유전자 (Open Bio Systems 구입)와 PKA Ca WT, K73H 유전자는 포유류에서 발현 시킬 수 있는 pCS2 vector에 cloning 했다. HA로 표지 된 AKT2 wildtype (Addgene #9016)과 dominant negative (Addgene #60128)는 pcDNA3 vector에 cloning 했으며, constitutively active (Addgene #9016)는 구매하여 사용하였다.

Table 1. Primers used for enhancer and shRNAs

Genes	Forward	Reverse
Stam1 P3 enhancer	GATCTTTAATTAATTAGTTAA TTAATATATG	GATCCATTAATTAATTAAGT AATTAATTAAA
Arhgap36 enhancer	ACTGCCTATTCGCATCGGCC TTTGA	TTCTGCGGAGCCATTAGTG CGATTG
Stam1 siRNA	AUCCUUAUGGUUCACUCUCt t	GAGAGUGAACCAUAAGG AUtt
Shh shRNA	GATCCAAGCTCTTCTACGTC ATCGTTCAAGAGCACTTTTA	AGCTTAAAAAAGCTCTT CTACGTCATCGTCTCTTGA ACGATGACGTAGAAGAGC TTG

5. In ovo electroporation

Chick embryo의 neural tube에 plasmid의 주입은 Hamburger and Hamilton (HH) 13에서 이루어졌다. 본론에 명시된 바에 따라 3-4 일 후, 4 도의 PBS에서 embryo를 적출, 4 % PFA에서 2 시간 이상 고정했다. OCT를 이용해서 얼린 embryo 조직은 실험에 따라 12-18 um로 동결 절단 했다.

6. 배아 줄기 세포 분화

Mouse embryonic stem cell을 운동 신경 세포로 분화 시키기 위해 F-12:neurobasal medium, 200 mM L-glutamine, 1 % 항생제, 10 % knockout serum replacement, 0.1 % β -ME를 함유한 advanced DMEM 배지 (ADFNK)에 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 로 세포를 이용하였다 (0 일). 1, 2, 4, 5 일에 배지를 교체했고, 2, 4, 5 일에 1 uM ATRA와 0.25 uM SAG (Calbiochem)를 처리하였다. AKT1/2 kinase inhibitor (iAKT1/2, Sigma Aldrich A6730)는 4, 5 일에 10 uM로 처리하였다.

7. In situ hybridization

Mouse와 chick embryo의 spinal cord에서 추출한 cDNA에서 다음의 유전자들을 표적 하는 probe를 디자인하여 각각 pBluescript vector에 cloning 하였다. Probe가 시작하는 5' 말단의 제한 효소로 자른 후, 반대 쪽 말단의 promoter에서 전사를 시작하는 중합 효소를 이용, 해당 유전자의 antisense를 제작했다. 각 유전자 probe는 digoxigenin으로 표지 된 RNA로 전사되어 BCIP/NBT와 색 반응을 통해 조직에서 각 유전자의 발현을 확인하는데 이용되었다.

Table 2. Primers used for probe designing

Chick	Forward	Reverse
Stam1	ARK genomics	
Cxcr4	GCATGGACGGTTTGGATCTG	TTGGTGGCATGGACTATTGC
Cxcr7	TCAACAAAAGTGCCCTGCT C	CAAGAAGCCACACCAGGAT G
Ptch1	GGTGCTGCTTCCTGTTCTTC	CTTCCCTCACTTCCTGCTTG
Gli1	GTGGCTCCTATGGTCACCTC	GGATGTGCTCGTTGTTGATG
Shh	AAGAGAACACGGGAGCTGA C	TCGAGGAAGGTGAGGAAGT C
Mouse	Forward	Reverse
Arhgap3 6	CCCAATTGCTCAACAAATCC	GGAGAGCAGTTCCAAACAC C
Shh	CCAATTACAACCCCGACATC	CTCCGGGACGTAAGTCCTTC

8. 형광 염색 법

고정된 chick과 mouse의 embryo 조직을 12 um로 절단하여 12 시간 이상 본문에 명시 된 해당 1차 항체와 반응 시켰다. Tween이 함유된 PBS로 세척 후, 2차 항체와 상온에서 반응 시킨 후, Zeiss 형광 현미경으로 관찰 및 분석하였다.

9. Western blot과 Immunoprecipitation

세포 및 mouse 또는 chick embryo의 spinal cord는 20 mM Tris (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % NP40, 2 mM PMSF, 200 mM NaF, 20 mM sodium pyrophosphate, 10 % glycerol, and 4 mM sodium orthovanadate를 포함하는 buffer와 sonicator를 사용하여 용해 시킨 후, 원심분리기를 이용하여 상층액을 취하였다. 획득한 세포 추출액의 단백질 농도를 정량 하기 위해 BSA와 Bradford를 사용하였다. Immunoprecipitation은 해당 항체를 2 시간 동안 4 도에서 반응 시킨 후 protein A agarose로 침강 시켰다. SDS-PAGE gel electrophoresis를 통해 각 시료를 7-12 % gel에서 전기영동, NC membrane에 단백질을 전이 시켜 해당 1차 항체와 HRP-conjugated IgG를 통해 분석하고자 하는 단백질의 양과 상호작용을 확인할 수 있었다.

Table 3. List of antibodies used for IP, western blot, IHC

IP		
Antigen	Catalog #	Supplier
HA	MMS-101R	Covance
ARHGAP36		제약
mouse IgG	sc-2025	Santa Cruz
rabbit IgG	sc-2027	Santa Cruz
Western Blot		
Antigen	Catalog #	Supplier
HA	MMS-101R	Covance
FLAG	F3165	Sigma
MYC	9E10	Millipore
CXCR4	ab2074	Abcam
GLI1	2534	Cell Signaling
GLI3	AF3690	R&D Systems
ARHGAP36	HPA-002064	Sigma
pSER	9651	Cell Signaling
p-AKT	9271S	Cell Signaling
b-tubulin	sc-9104	Santa Cruz

IFC		
Antigen	Catalog #	Supplier
GFP	A11122	Invitrogen
LacZ	Ab9361	Abcam
HB9/MNR2	5C10	DSHB
STAM1	12343-1-AP	Proteintech Group
CXCR4	ab2074	Abcam
HRS	Ab70180	Abcam
EEA1	610457	BD Transduction Laboratory
ARHGAP36		제작
HB9		OHSU 제작
FoxP1	ab16645	Abcam
FoxP1	AF4534	R&D Systems
ISL1	Ab109517	Abcam
NKX2.2	5A5	DSHB
PAX6		DSHB
OLIG2	ab15328	Abcam
LHX3	ab14555	Abcam
CHX10		OHSU 제작
nNOS	24287	Immunostar
LIM1	ab14554	Abcam

10. RNA 추출 및 실시간 중합효소연쇄반응 (qPCR)

Trizol (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 추출 했고 Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용한 역전사를 통해 cDNA를 합성했다. 각 시료는 SYBR-Green (Enzynomics)과 다음에 제시한 primer를 이용한 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 분석했다.

Table 4. Primers used in qPCR

qPCR		
Gene	Forward	Reverse
Hb9	GTTGGAGCTGGAACACC AGT	CTTTTGTCTGCGTTTCCAT T
Stam1	CTGCAGATCTTACTGCTG AACC	TCAAGATGAAGCAGCTCT GG
Arhgap36	TGGGATCCAAGAGGAAG ATG	CAGCCACATCATGGACATT C
Cyclophilin A	GTCTCCTTCGAGCTGTTT GC	GATGCCAGGACCTGTATG CT
ChIP PCR		
Gene	Forward	Reverse
Hb9-MN enhancer	TACTCTCCCTACAGTCTCT GGGGT	TGTCCAGAAATCCACAGG CCTGCG
Stam1-P1 enhancer	TGCTAGGTAACAACCTAA CAATTT	CTTCCCCTATTGGTATGG GAAGC
Stam1-P2 enhancer	TCAGTGTCTAAATGCTGA GCAGTA	GACAAAGAAACAAAGGC AGAGAAT

Stam1-P3	AGTGTGCACTAAAGTATG	ATAAGCGGATGTGCACGT
enhancer	GAAAGC	AGGTCA
Stam1-P4	TCCTATGCTCCCTTGTTAC	CTGACAGTGATTGTGAGC
enhancer	AAATC	AGGCAT
Stam1-P5	GATGGAAGAGAACAGAA	CAATCTCTCATATCATGTT
enhancer	TCAGTCC	CGAGA
Arhgap36	ACCTTGTAGCAGGACTGG	AGCCATTAGTGCGATTGCT
enhancer	GGT	CT
Untr6	TCAGGCATGAACCACCAT	AACATCCACACGTCCAGT
	AC	GA

11. Reporter assay

형질 감염 시킨 세포는 cell lysis buffer를 통해 상온에서 20 분 간 용해시킨 후, 원심분리기를 이용하여 상층액을 취하였다. 형질 감염 효율을 확인하기 위해 대조군으로 사용된 LacZ는 beta galactose buffer와 반응시킨 후, 흡광기를 이용하여 430 nm에서 측정하였다. Reporter activity는 luciferin (Promega)과 반응 시킨 후 발광기를 이용하여 측정하였다.

12. Primary motor neurons 배양

ICR wildtype embryo E9.5의 spinal cord를 분리한 후, L15 PSG (Gibco, 21083-027)로 세척하였다. 37 도에서 40 분 동안 0.025 % trypsin (Gibco, 15050-057)을 함유한 L15 (Corning, 10-045-CVR)에 현탁 시켰다. DMEM/F12 (3:1, v/v) (DMEM: Biowest, L0103-500, F12: Gibco, 11765-054)를 첨가하여

spinal cord가 바닥에 가라앉도록 하고, DNase를 포함한 0.004 % DMEM/F12 (3:1) 배지로 교체 후 5 분간 배양 하였다. 다음, DMEM/F12 (3:1)에서 4 % BSA 쿠션을 준비하고 세포의 분쇄가 완료되면 세포 현탁액을 그 위에 옮겼다. 10 분 동안 4 도에서 샘플 100 g로 원심 분리하고 상층액을 제거 하였다. 0.004 % DNase DMEM/F12에 재현탁 된 세포를 차가운 7.05 % Nycoprep (Axis-shield, 114550) 층 위에 옮기고 4 도에서 20 분 동안 500 g로 원심 분리 하였다. 상층액을 제거하고, 0.004 % DNase 배지에 재현탁 시키고 300 g, 4 도에서 10 분 동안 원심 분리 시켰다. 운동 신경 세포는 2 % B-27 serum free supplement와 0.05 mM L-glutamine이 함유 된 Neurobasal-A Medium (Gibco, 10888-022)과 5 ug/ml bovine insulin을 함유하는 DMEM/F12 (3:1), 10 % FBS, 10 ng/ml h-BDNF, 10 ng/ml h-GDNF, 25 ng/ml r-CNTF, 10 ng/ml LIF 및 10 nM Dexametasone을 포함하는 basal MN 배지에 재현탁 시켰다. 분리된 운동 신경 세포는 미리 준비한 laminin/poly-D-lysine으로 코팅 된 챔버 슬라이드에 도말 하고 24 시간 동안 배양 하였다.

13. 통계 분석

대조군과 실험군 사이의 유의성은 student's t-test를 통해 확인했고 p-value로 표시했다 (ns $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). 값은 그룹 내 평균과 표준오차로 나타내었다.

결과

STAM1의 기능

1. Stam1 유전자 내 ISL1-LHX3 complex의 결합 위치 및 전사 유도 확인

기존의 연구에 따르면, ChIP-seq을 통해 ISL1-LHX3 complex가 결합하는 genomic DNA 서열을 분석한 결과, 이 complex는 운동 신경이 그만의 특징을 가질 수 있게 해주는 유전자들을 표적 하고 그들의 발현을 조절하게 해준다고 알려져 있다 (S. Lee et al., 2012). ISL1-LHX3 complex의 여러 표적 유전자들 중 하나인 Stam1은 외부 신호에 의해 CXCR4의 endocytosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 여기서 CXCR4는 그 ligand인 SDF-1과 함께 운동 신경 axon의 방향성을 지정하는데 중요한 요소로 알려져 있기 때문에 (Lieberam et al., 2005), STAM1이 운동 신경 분화 후, ventral exit point를 찾아 뻗어 나가는 과정에 관여할 것이라고 추측했다. 위에서 언급한 ChIP-seq 결과, Stam1 유전자에서 ISL1-LHX3 complex가 결합할 수 있는 부분, 총 5개 (P1-P5)를 식별할 수 있었고, 그 중 promoter에 위치한 P1과 intron에 위치한 P3는 HxRE와 유사한 서열을 지니고 있

음을 확인했다 (Figure 4A).

실제로 Stam1 유전자의 5부분에 ISL1-LHX3 complex가 결합하는지 알아보기 위해 mouse E12.5 embryo의 spinal cord를 분리해 내, ISL1과 LHX3 항체를 이용해 ChIP assay를 시행해 본 결과, 5 위치 모두 ISL1과 LHX3가 결합하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4B and 4C). 또한, P3의 HxRE 서열을 반복해서 이어 붙인 후 luciferase나 GFP reporter를 연결하여 ISL1-LHX3 complex에 의해 Stam1 유전자의 전사 활성이 일어나는지 보았다. P19 cell의 경우 ISL1과 LHX3를 함께 transfection시켜 둘이 complex를 이룰 수 있는 경우에만 reporter의 활성을 보였다 (Figure 4D). 마찬가지로, GFP reporter의 in ovo electroporation 결과, endogenous ISL1과 LHX3가 발현되고 있는 운동 신경에서만 GFP의 활성을 보였고, ISL1과 LHX3를 함께 과발현 시켜 dorsal spinal cord에 형성된 ectopic HB9+ 세포 (운동 신경)에서도 GFP가 활성화 되는 것을 볼 수 있었다 (Figure 4E).

Postmitotic 운동 신경에서 ISL1의 발현이 현저하게 감소한 HB9/ISL2 dKO embryo는 ISL1-LHX3 complex 형성이 어려운 모델이다 (Thaler et al., 2004). Dorsal spinal cord의 STAM1 발현 양과 비교했을 때 운동 신경에서의 STAM1의 발현이 감소함을 관찰할 수 있다 (Figure 4F). 위의 결과들을 통해, Stam1 유전자의 전사는 ISL1-LHX3 complex가 HxRE에 결합하여 직접 STAM1의 발현을 조절한다고 결론 내릴 수 있다.

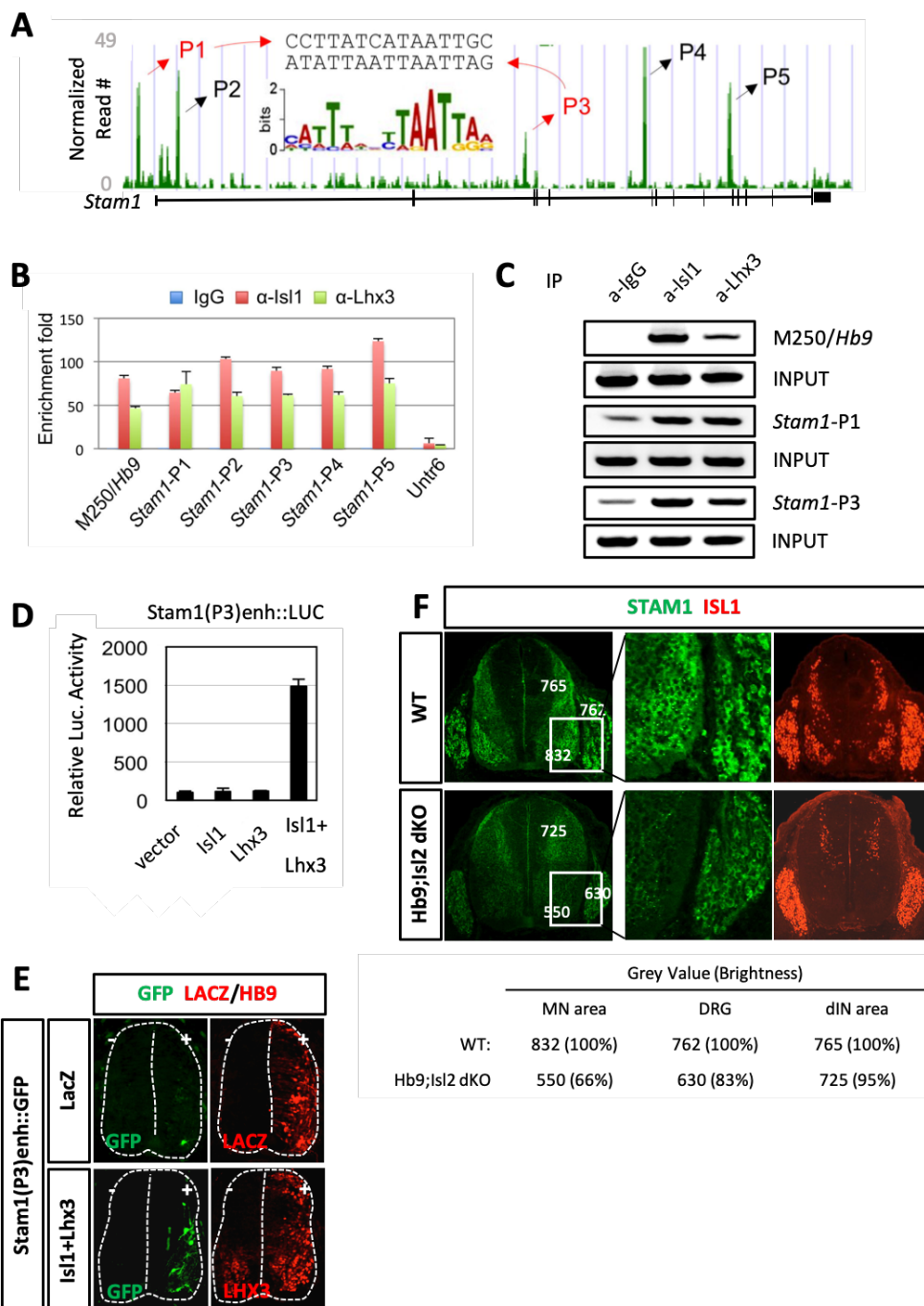


Figure 4. ISL1-LHX3 complex regulates the transcription of Stam1 through HxRE

(A) ChIP-seq data showing 5 possible ISL1-LHX3 binding sites. P1 and P3 contained sequences similar to HxRE motif. (B) and (C) ChIP assay against IgG, ISL1, and LHX3 using mouse E12.5 spinal cord and qPCR of P1-P5 sites, M250/Hb9 as positive control and Untr6 as negative (n=2). (D) Luciferase reporter assay in P19 cells using P3 HxRE motif in Stam1 (n=3). (E) Chick in ovo electroporation of GFP reporter linked to P3 of Stam1 under the presence of or without ISL1 and LHX3 (n=3) (F) Comparison of STAM1 intensity in WT and Hb9;Isl2 dKO. For B and D, data are shown as the mean \pm s.d.

2. Embryo의 spinal cord 운동 신경에서 STAM1의 발현 양상

앞서 내린 결론을 토대로 추론해보면, ISL1-LHX3 complex가 존재하는 운동 신경에 STAM1이 발현됨으로써 운동 신경이 성숙되어 가는 과정에 기여할 것으로 추측할 수 있다. 따라서 mouse embryo spinal cord에서의 STAM1의 발현 양상을 확인해 보았다. 운동 신경의 마커인 HB9으로 확인했을 때 E9.5의 STAM1은 HB9이 발현되는 운동 신경 중 lateral에서 시작되어 E10.5에서는 STAM1이 HB9을 발현하는 세포 전반에 걸쳐 더 강하게 발현되는 것을 볼 수 있다. 특히 운동 신경에서 ISL1의 발현 양상과 일치하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 5A).

P19 cell에 ISL1-LHX3와 함께 NGN2를 transfection 시켜 운동 신경으로 분화 시켰을 때, 운동 신경의 마커인 Hb9의 mRNA 발현 양이 증가했음을 통해, 분화가 잘 됐음을 확인할 수 있었다. 이 때, Stam1의 mRNA 발현 양 또한 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 5B). 마찬가지로 mouse embryonic stem cell (mESC)를 RA와 PURM 처리를 통해 운동 신경으로 분화 시켰을 때, HB9이 발현됨을 통해 분화가 됐음을 확인했다 (Wichterle et al., 2002). STAM1의 발현 양이 분화가 종료된 Day 6에서 증가한 것을 통해 운동 신경 세포에서 STAM1이 발현된다고 결론 지을 수 있었다 (Figure 5C). 세포 수준에서 STAM1의 발현 양상을 살펴

보기 위해서, E9.5의 spinal cord에서 일차 운동 신경 세포를 분리해 내어 IHC를 통해 확인해 보았다. HB9+ 세포의 세포질과 axon에 STAM1이 발현 되어 있음을 볼 수 있었고, endocytosis에서 분류 기능을 하는 초기 endosome의 지표인 early endosomal antigen 1 (EEA1)과 같은 위치에 존재하는 것을 관찰했다 (Figure 5D). 따라서 STAM1은 endosome 형성과 관련된 단백질과 공존하여 embryo의 spinal cord 운동 신경에서 endocytosis를 유도할 것이라 추측할 수 있다.

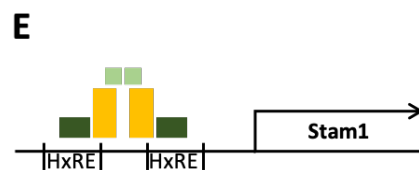
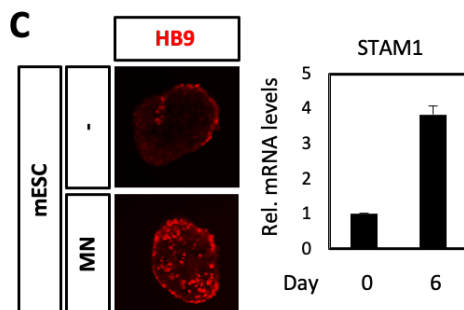
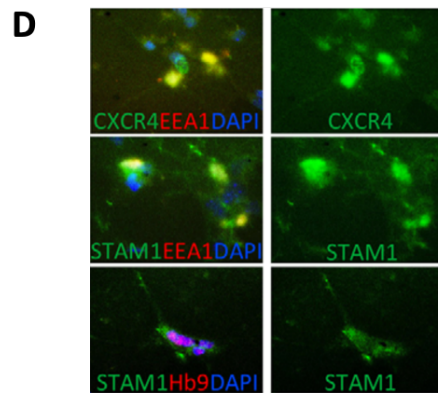
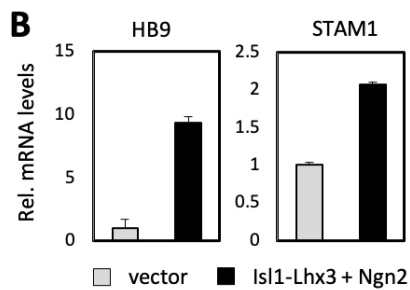
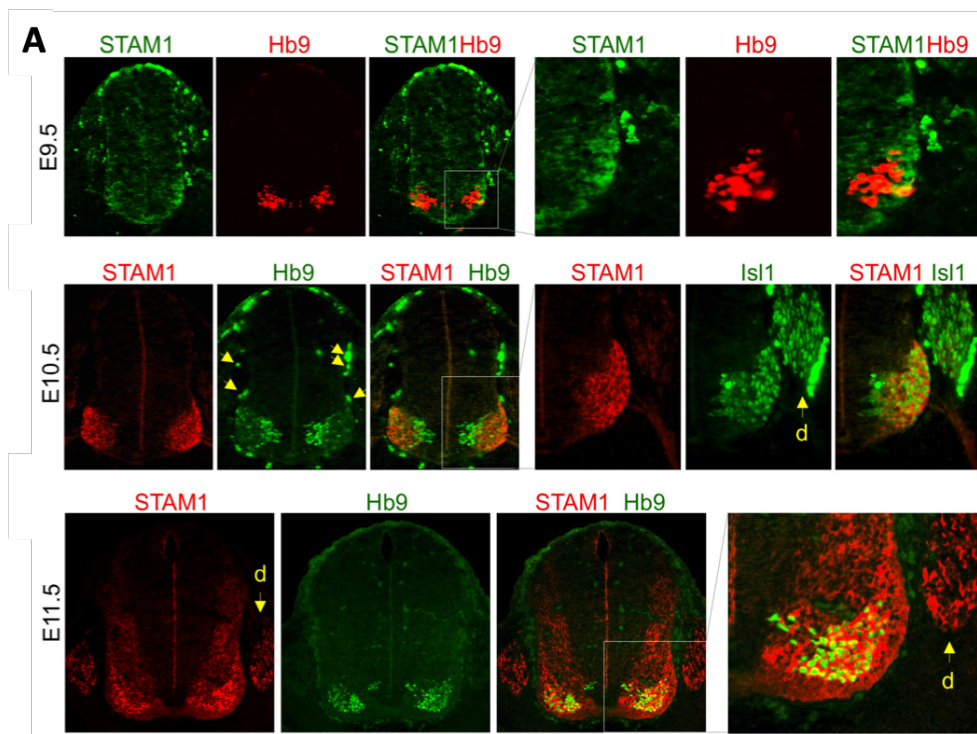


Figure 5. STAM1 expression pattern in spinal motor neurons

(A) IHC showing the expression patterns of STAM1, HB9, and ISL1 in the spinal cords from E9.5 to E11.5. (B) qRT-PCR of HB9 and STAM1 in P19 cells differentiated to MN. (C) IHC showing mESC is differentiated into MN. qRT-PCR of STAM1 in mouse ESCs differentiated into MN (n=2). (D) IHC of E9.5 primary motor neurons with STAM1, CXCR4, and EEA1. (E) Schematic illustration of how ISL1-LHX3 complex controls the transcription of *Stam1* through HxRE in motor neurons. For B and C, data are shown as the mean \pm s.d.

3. STAM1의 ESCRT-0 복합체 형성을 통한 CXCR4 단백질 양 조절

기존 연구에 따르면 STAM1과 HRS는 endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT-0)를 형성하여 CXCR4와 같은 단백질들의 endocytosis에 관여 한다고 알려진 바 있다 (Bache et al., 2003; Kennedy & Marchese, 2015; Kojima et al., 2014; Mizuno et al., 2004). 따라서 spinal cord의 운동 신경 발달 단계에서도 마찬가지로 STAM1이 HRS와 함께 이 복합체를 형성함으로써 CXCR4의 단백질 양을 조절할 것이라고 추측하였다.

ISH과 IHC를 통해 HH18의 chick embryo의 spinal cord의 운동 신경에서 HRS와 CXCR4가 STAM1과 유사한 발현 양상을 보임을 확인했다 (Figure 6A). 한편 SDF1의 또 다른 수용체로 알려진 CXCR7은 chick embryo spinal cord의 ventricular zone에서 발현 되었지만 운동 신경 세포에서는 존재하지 않았다 (Figure 5B). 또한 세포 수준에서 STAM1, CXCR4, HRS 단백질들의 발현 위치가 CXCR4의 ligand인 SDF1에 의해 어떻게 변하는지 살펴보기 위해 cytoplasm이 cell의 전체 크기에서 차지하는 비율이 높은 HEK293 cell에 transfection 한 후, IHC를 시행해 보았다. SDF1이 없는 조건에서 STAM1가 HRS, CXCR4와 함께 세포질에 존재하지만, SDF1을 처리했을 때 CXCR4의 endocytosis가 유도되면서 endosome으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 5C). 또 HEK293 세포에 STAM1, CXCR4, HRS를

transfection 시킨 후, IP를 통해 SDF1의 존재 유무에 따라 세 단백질 사이의 관계를 살펴 보았다. STAM1과 HRS, CXCR4는 사이의 interaction을 확인할 수 있었고, 여기서 SDF1의 처리는 CXCR4와 STAM1의 interaction을 증가시켰다 (Figure 5D).

앞서 언급한 가설을 뒷받침 하기 위해 chick embryo의 spinal cord에서 STAM1의 발현 양이 감소 되었을 때 CXCR4의 양이 변화하는지 알아보 고자 하였다. 대조군 (si-ctrl)과 chick STAM1을 특이적으로 감소 시킬 수 있는 si-RNA (si-STAM1)을 in ovo electroporation을 통해 chick embryo의 spinal cord에 주입한 후, 각 si-RNA가 주입된 쪽과 그렇지 않은 쪽으로 나누어 CXCR4로 western blot을 수행하였다 (Figure 5E). 우선 chick embryo spinal cord에서 si-STAM1에 의한 STAM1 발현이 특이적으로 감소한 것을 확인했고, 대조군이 주입된 embryo에서는 CXCR4의 발현 양이 변하지 않지만, si-STAM1의 주입으로 인해 CXCR4의 단백질 양 또한 감소 하는 것을 관찰할 수 있었다. 반대로, chick embryo의 spinal cord에 STAM1을 과 발현 시켰을 때, CXCR4의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 보아 CXCR4 단백질 양이 STAM1에 의해 조절된다는 것을 알 수 있었다. 위의 결과들을 토대로 STAM1은 HRS와 함께 ESCRT-0 복합체를 형성하여, 운동 신경에 존재하는 활성화된 CXCR4의 endocytosis를 유도한다는 결론 을 내릴 수 있었다.

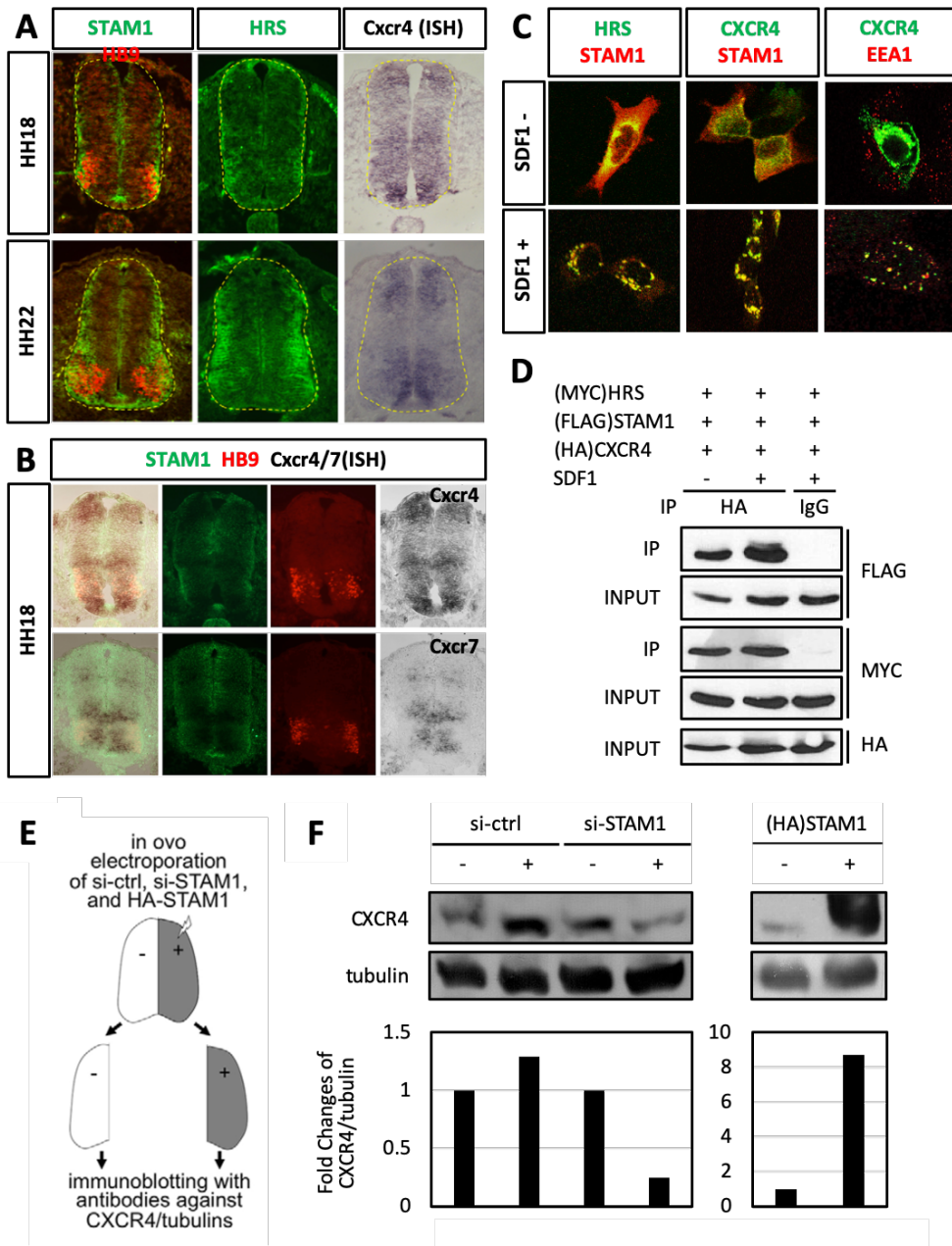


Figure 6. Regulating CXCR4 protein levels through ESCRT-0 machinery

(A) IHC and ISH of STAM1, HB9, HRS, and CXCR4 in chick HH18 and HH22 (B) IHC and ISH of STAM1, HB9 and CXCR4/7 in chick HH18 (C) IHC of HEK293 cells transfected with STAM1, HRS, and CXCR4, showing relocation of each proteins to early endosomes with or without SDF1. (D) IP assay against CXCR4. HEK293 cells were transfected with STAM1, HRS, and CXCR4 with or without SDF1. (E) Illustration of how (F) was performed. (F) In ovo electroporation of si-ctrl and si-STAM1 and CXCR4 level was detected by western blot. The band intensity was measured using ImageJ. (For A-F, n=3)

4. STAM1과 CXCR4의 과발현 및 발현 감소로 인한 운동 신경 axon의 방향성 상실

기존의 연구 결과에 따르면 CXCR4는 운동 신경의 axon에 발현되어 그 ligand인 SDF1과의 작용을 통해 axon이 ventral spinal cord로 뻗어 나갈 수 있게 해준다고 알려져 있다 (Lieberam et al., 2005). 앞서 보인 결과들과 함께 STAM1에 의해 CXCR4의 endocytosis가 조절되고 그로 인해 발달 중인 embryo의 spinal cord에서 STAM1 또한 운동 신경 axon의 방향성 지정에 중요할 것이라고 가정했다. 따라서 si-RNA를 통한 STAM1 발현의 감소가 Cxcr4가 결실된 mouse (Lieberam et al., 2005)에서 보인 것과 유사한 spinal cord 운동 신경 axon의 dorsal projection을 확인하고자 하였다.

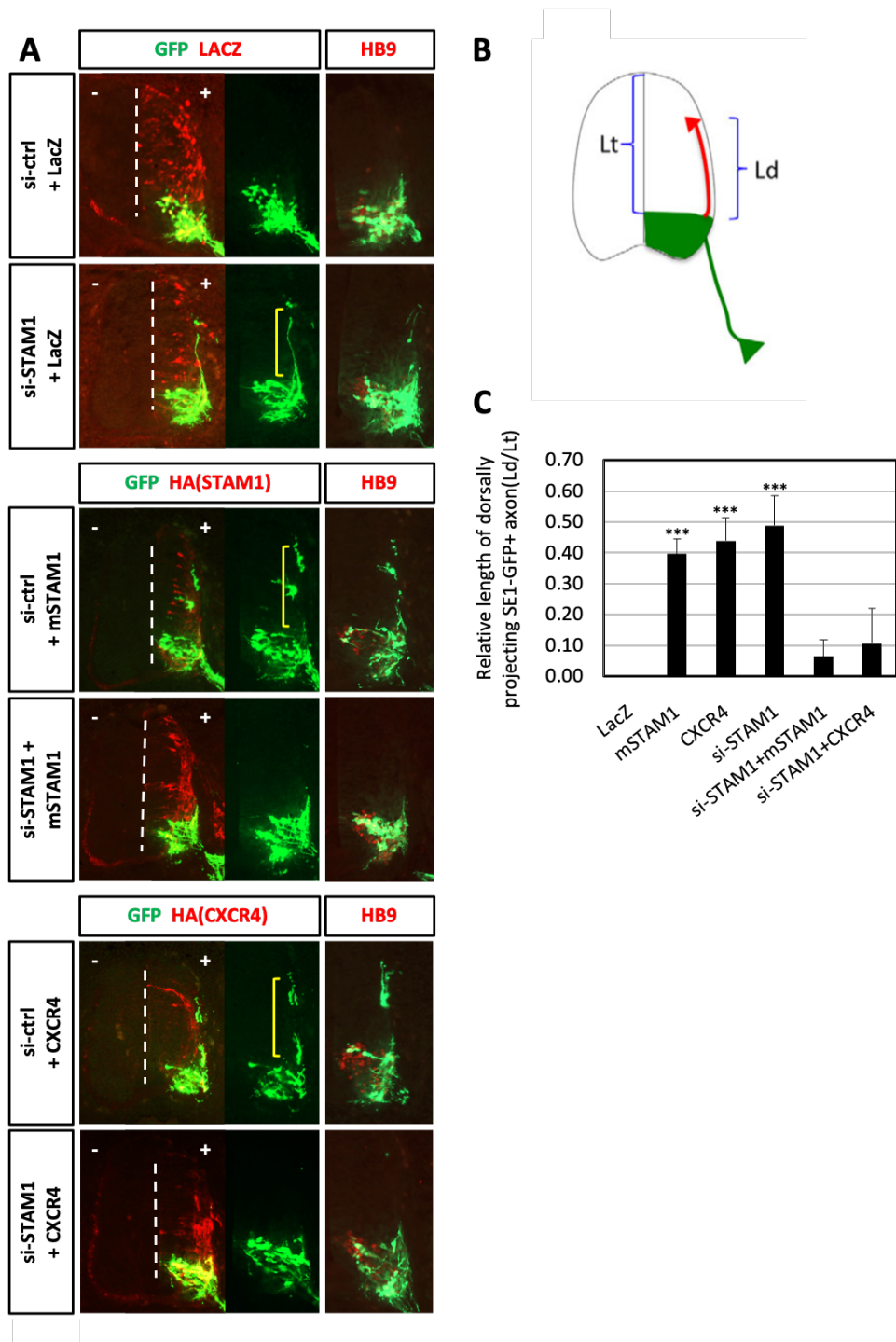
STAM1의 발현 수준이 감소된 운동 신경 axon의 trajectory를 살펴 보기 위해 si-STAM1과 함께 운동 신경의 axon를 GFP로 표지 하는 SE1-GFP를 주입했다 (Song et al., 2006). si-STAM1의 주입은 GFP를 발현하는 axon으로 하여금 ventral exit point로 나가는 trajectory 뿐만 아니라 dorsal spinal cord로 방향을 바꾸게 하였다. 이러한 표현형은 si-STAM1의 영향을 받지 않는 mouse STAM1이나 CXCR4가 같이 주입 되었을 때 사라지는 것을 발견했다. 또한 STAM1이나 CXCR4의 과발현도 GFP를 발현하는 운동 신경 axon으로 하여금 dorsal spinal cord로 뻗어가게 하였다 (Figure 7A). Axon이 dorsal spinal cord로 뻗어 나가는 정도를 정량화 하기 위해

dorsally projecting axon을 운동 신경이 발현되는 가장 dorsal end부터 시작한 길이 (Ld)가 spinal cord의 중앙선 길이 (Lt) 대비 어느 정도인지 주입된 대조군과 si-RNA 별로 측정해 보았다 (Figure 7B). 그 결과 si-STAM1 뿐만 아니라 STAM1과 CXCR4의 과발현 또한 대조군과 비교해 유의미한 정도로 axon의 trajectory가 변하는 것을 알 수 있었다. 하지만 이러한 표현형은 앞서 언급했듯이, si-STAM1과 STAM1이나 CXCR4를 함께 주입했을 때 다시 기저 수준으로 복귀되었다 (Figure 7C). 여기서 si-STAM1이나 STAM1 혹은 CXCR4으로 인해 dorsal spinal cord로 유도된 axon은 HB9을 발현하고 있지 않는다는 것을 통해 이 axon은 ectopic하게 형성된 운동 신경에서 유래한 것이 아닌 원래의 위치에서 발현하고 있는 운동 신경에서 나온 것임을 추측할 수 있었다.

그렇다면 STAM1과 CXCR4의 적절한 양이 axon의 trajectory 선정에 영향을 주는지 알아보기 위해 두 단백질의 양을 여러 수준으로 나누어 chick embryo의 spinal cord에 주입해 보았다. STAM1이나 CXCR4의 양이 증가함에 따라 dorsal spinal cord로 뻗는 axon이 빈번하게 관찰되었고, 반대로 si-STAM1에 의해 형성된 axon의 비정상적인 경로는 함께 주입시키는 STAM1이나 CXCR4의 발현 양이 증가함에 따라 복구되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7D).

정리하자면, STAM1과 CXCR4의 비정상적인 발현은 spinal cord의 운

동 신경으로 하여금 axon이 dorsal spinal cord로 뻗어가게 하는 표현형을 초래한다고 결론지을 수 있다. SDF1에 의해 활성화 된 CXCR4의 발현 수준은 STAM1에 의존적으로 조절되며 운동 신경 axon이 ventral projection을 유지하는데 중요한 역할을 할 것이라고 판단할 수 있었다.



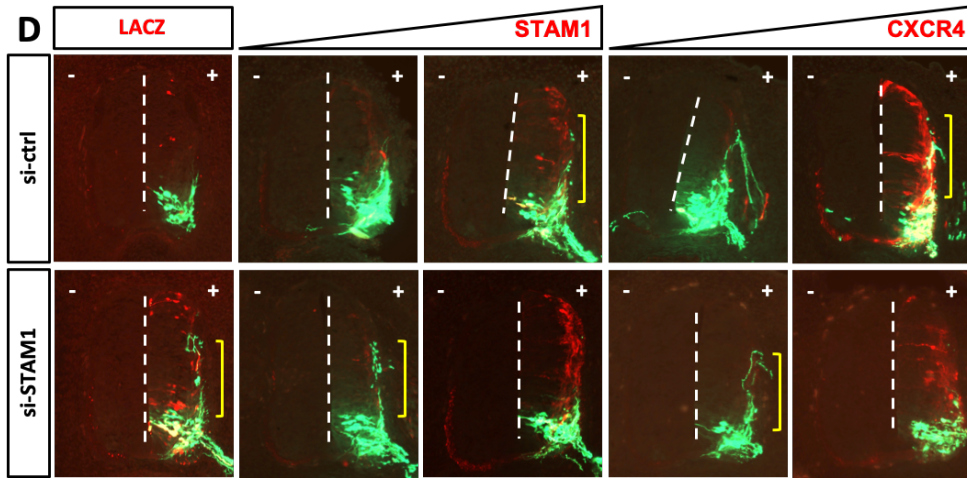


Figure 7. Expression levels of STAM1 and CXCR4 are essential in finding ventral exit points of vMN

(A) In ovo electroporation of si-ctrl, si-STAM1, STAM1, si-STAM1+STAM1, CXCR4, and si-STAM1+CXCR4 with SE1-GFP to observe GFP+ axons' projection.

(B) Schematic showing WT motor neurons and their axonal projection in green. Ld is the length of dorsally projecting axons and Lt is the length of spinal cord from dorsal end of the MN to roof plate. (C) Length of dorsal projection (Ld) relative to spinal cord size (Lt). (At least 5 images were quantified per combination. Data are shown as the mean \pm s.d., * $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) (D) In ovo electroporation of altered amount of STAM1 and CXCR4 with SE1-GFP. (For A and D, $n=2$, at least 3 embryos for each combinations)

ARHGAP36의 기능

1. Isl1-Lhx3 complex의 표적 유전자인 Arhgap36의 spinal cord 내 전사 조절

ISL1-LHX3 는 앞서 언급했듯이 NLI 와 함께 다양한 유전자의 전사를 조절하여 운동 신경 형성을 유도하고 interneuron 과 관련된 유전자를 억제하는 ISL1-LHX3 complex 를 형성한다고 알려져 있다 (S. Lee et al., 2008). 이전의 연구를 통해 ISL1-LHX3 complex 의 표적이 되는 후보 유전자들을 밝힐 수 있었고, Arhgap36 는 여러 표적 유전자들 중 하나였다 (S. Lee et al., 2012). ChIP-seq 데이터로부터 Arhgap36 의 enhancer region (Figure 8A)에서 ISL1-LHX3 의 표적 부위인 HxRE (CTAATTG)를 확인 하였다. E12.5 mouse embryo spinal cord 를 이용한 ChIP assay 에서 ISL1 과 LHX3 가 Arhgap36 의 enhancer 에 결합함을 확인할 수 있었다 (Figure 8B). Doxycycline (Dox) 처리 시, Flag-tagged Isl1-Lhx3 를 과발현 할 수 있는 inducible mouse ES cell 을 사용하여 운동 신경으로의 분화를 유도 하였을 때, ISL1-LHX3 complex 가 실제로 Arhgap36 의 enhancer 에 모집 되었음을 PCR 을 통해 확인했다 (Figure 8C).

ISL1-LHX3 complex 가 Arhgap36 전사를 조절할 수 있는지를 더 확실하게 하기 위해 Arhgap36 의 유전자에서 HxRE 를 합성하여

Luciferase 와 GFP 와 같은 reporter 유전자 앞에 연결시켰다 (Figure 8A). 이 시스템을 사용하여 P19 cell 에서 Arhgap36-enh(2x)::LUC reporter 가 Isl1 과 Lhx3 가 함께 transfection 되었을 때 reporter activity 가 가장 높은 반면, Isl1 또는 Lhx3 가 따로 주입 된 경우에는 활성을 거의 보이지 않음을 알 수 있었다 (Figure 8D). 또한 chick embryo spinal cord 에 Arhgap36-enh(2x)::GFP 를 in ovo electroporation 하게 되면 endogenous 하게 발현되어 있는 ISL1-LHX3 complex 에 의해 운동 신경 영역에서 GFP 가 발현되는 것을 확인하였으나, ectopic HB9 형성을 유도 할 수 있는 Isl1 과 Lhx3 를 함께 과발현 시킨 경우 GFP 발현은 dorsal spinal cord 에 ectopic 하게 발현된 HB9+ 운동 신경이 존재하는 곳까지 확장됨을 볼 수 있었다 (Figure 8E). 이러한 결과들은 ISL1-LHX3 complex 가 Arhgap36 enhancer 의 특정 motif 를 인식하고 결합하며 운동 신경이 발달 될 때 Arhgap36 유전자의 전사를 조절함을 보여준다.

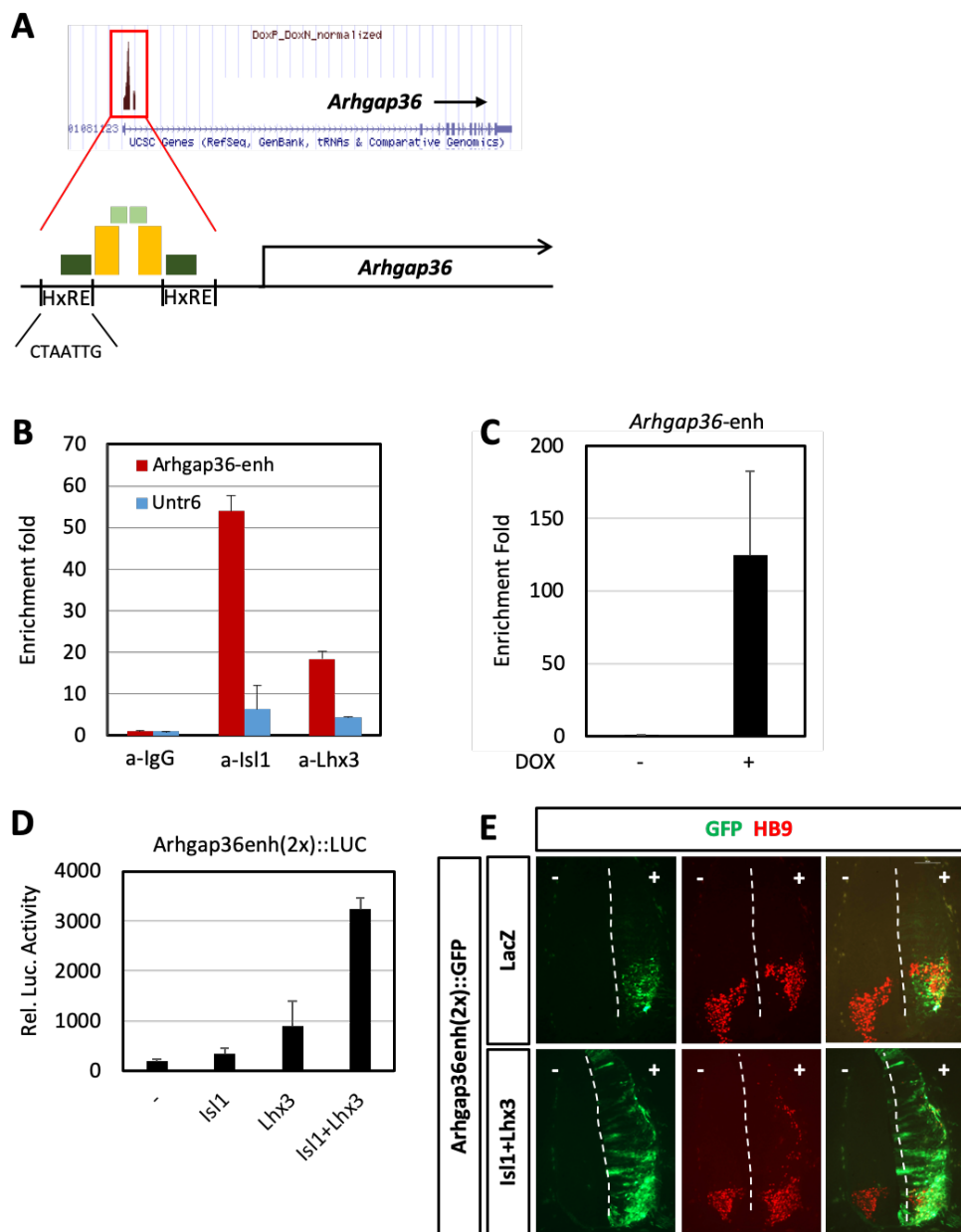


Figure 8. ISL1-LHX3 complex activates transcription of Arhgap36

(A) ChIP-seq results showing that Arhgap36 has HxRE where ISL1-LHX3 complex can bind. Schematic of reporter genes directed by 2 copies of Arhgap36 HxRE. (B) ChIP assay of mouse E12.5 spinal cord against IgG, ISL1, and LHX3, and qPCR of Arhgap36 enhancer region and Untr6 as negative (n=2) (C) qPCR of Arhgap36 enhancer with inducible mouse ESC expressing ISL1-LHX3 with Dox treatment (n=2). (D) Luciferase reporter assay of Arhgap36 enhancer in P19 cells (n=3) (E) In ovo electroporation of Arhgap36 enhancer linked to GFP reporter with or without Isl1 and Lhx3 (n=4). For B-D, data are shown as the mean \pm s.d.

2. Embryo spinal cord의 운동 신경 중 Lateral Motor Column에서 발현되는 ARHGAP36

ISL1-LHX3는 앞서 언급했듯이 NLI와 함께 다양한 유전자의 전사를 조절하여 운동 신경 형성을 유도하고 interneuron과 관련된 유전자를 억제하는 ISL1-LHX3 앞에서 언급한 바와 같이 Arhgap36 유전자의 전사가 ISL1-LHX3 complex에 의해 조절 된다는 것을 발견했으므로, 실제로 ARHGAP36가 spinal cord에서 발현되는 위치와 발현이 시작되는 시기를 알아보고자 했다. ARHGAP36가 운동 신경이 발달하는 시기의 어느 시점부터 발현되는지 확인해 보기 위해 retinoic acid (RA)와 Shh agonist인 purmorphamine (PURM)을 사용하여 wildtype mESC를 운동 신경으로 분화 시켰다 (Figure 9A). RT-PCR을 통해 Arhgap36 mRNA의 발현은 분화 시작 후 4 일 (운동 신경 분화의 초기 단계에 해당)부터 나타남을 볼 수 있었고, 분열이 끝난 postmitotic 운동 신경에 상응하는 6 일 쯤에 확연하게 증가 하였다. 이는 qPCR을 통해 정량화 해 본 결과, 배아 줄기 세포가 분화 6일 쯤에 완전히 성숙한 운동 신경 세포 되었을 때, Arhgap36 mRNA 수준이 0 일과 비교하여 적어도 ~100 배 이상 증가했음을 확인할 수 있었다 (Figure 9B).

다음으로 발달 중인 mouse spinal cord에서 Arhgap36 mRNA와 단백질의 발현 양상을 관찰 하였다. ISH와 IHC를 통해 E9.5부터 E10.5까지

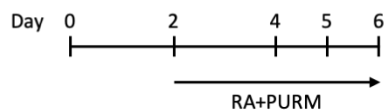
ARHGAP36는 spinal cord의 운동 신경에서 광범위하게 발현되는 것을 확인한 반면, spinal cord 외의 다른 조직에서는 ARHGAP36가 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 9C and 9D). 그러나 E11.5부터는 LMC에 제한적으로 발현되기 시작하며, E12.5부터는 ARHGAP36가 spinal cord의 brachial과 lumbar level의 LMC 신경의 위치에 국한되어 발현되어 있었다 (Figure 9C and 9D).

더 구체적으로 ARHGAP36가 어떤 운동 신경 세포에서 발현되는지 알아보기 위해, FoxP1과 같이 잘 알려진 LMC 지표와 함께 IHC를 진행하여 ARHGAP36의 발현 양상을 spinal cord의 rostral-caudal 축을 따라 비교해 보았다 (Dasen et al., 2008). E12.5 spinal cord의 brachial과 lumbar level에서 ARHGAP36를 강하게 발현하고 있는 집단은 FoxP1도 강하게 발현하고 있었다. 반면, thoracic level에서 관찰했을 때 FoxP1을 발현하는 PGC 세포에서의 ARHGAP36는 매우 약하게 발현되어 있었다 (Figure 9E). 또한 brachial level의 ARHGAP36 발현은 rostral보다 caudal에서 더 강했다 (Figure 9F).

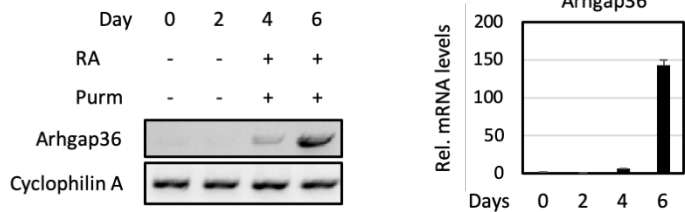
ARHGAP36에 관한 기존의 연구 결과에 따르면 Shh pathway에서 GLI transcription factor들의 활성을 유도한다고 알려져 있다 (Rack et al., 2014). Shh가 chick spinal cord의 운동 신경에서도 발현된다는 기존의 보고에 따라 mouse spinal cord 운동 신경에서도 ARHGAP36가 SHH와 연관성이 존

재할 것이라고 추측했다 (Oppenheim et al., 1999). E12.5의 mouse spinal cord를 openbook section을 통해 rostrocaudal axis를 따른 Shh, ARHGAP36, FoxP1의 발현 양상을 관찰해 본 결과, brachial level에서 FoxP1으로 확인되는 LMC에 ARHGAP36와 Shh가 함께 발현하고 있음을 확인했다 (Figure 9G). 종합하자면, ARHGAP36의 발현이 spinal cord 운동 신경의 초기 발달 단계부터 시작되고, brachial level의 LMC 운동 신경에서 Shh와 함께 제한적으로 발현된다고 결론지을 수 있다.

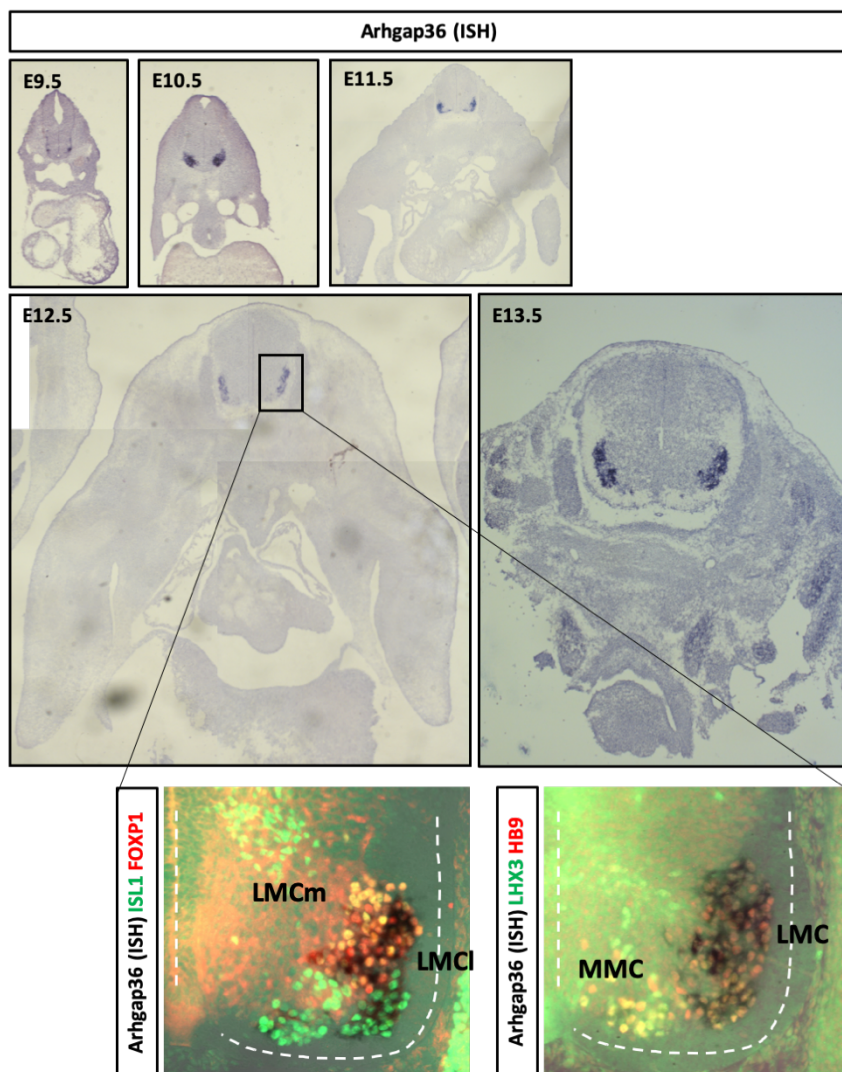
A <ESC DIFFERENTIATION SCHEME>

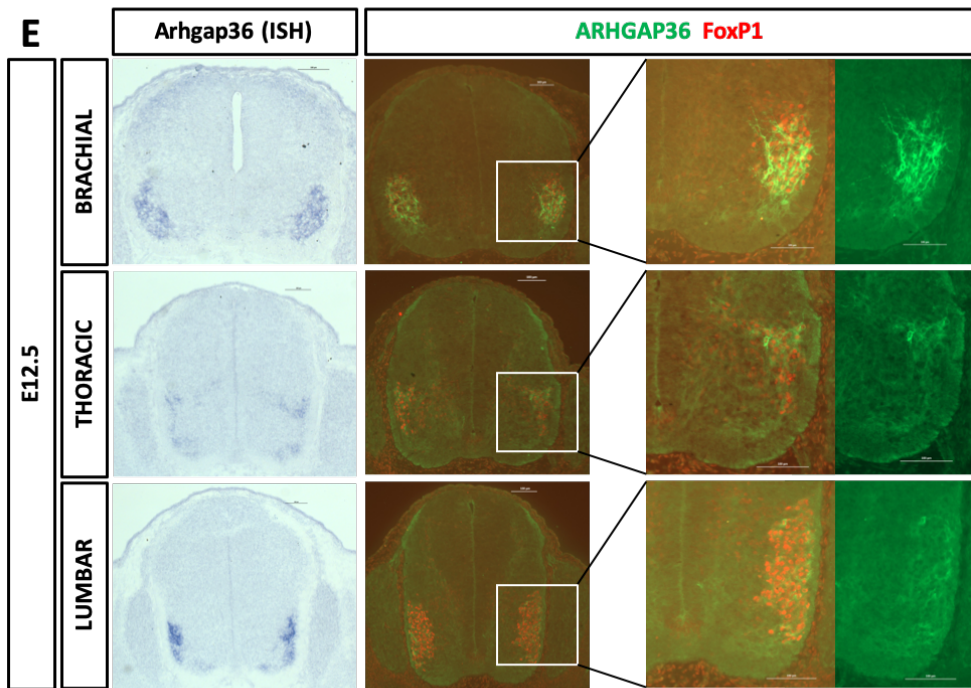
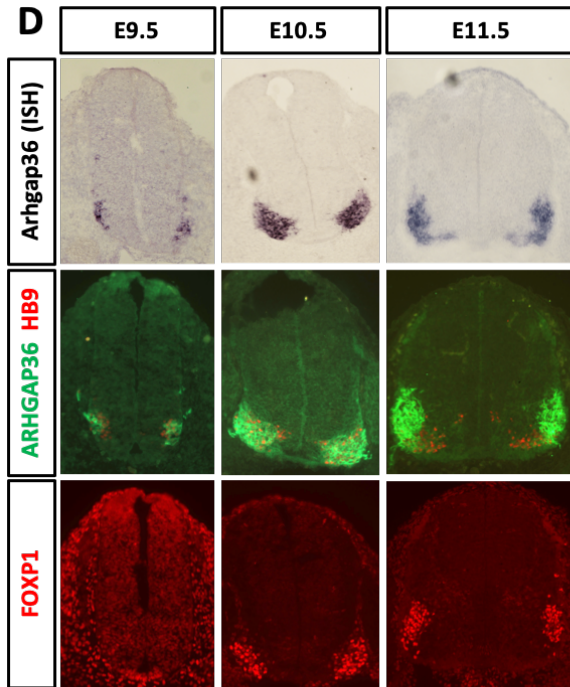


B



C





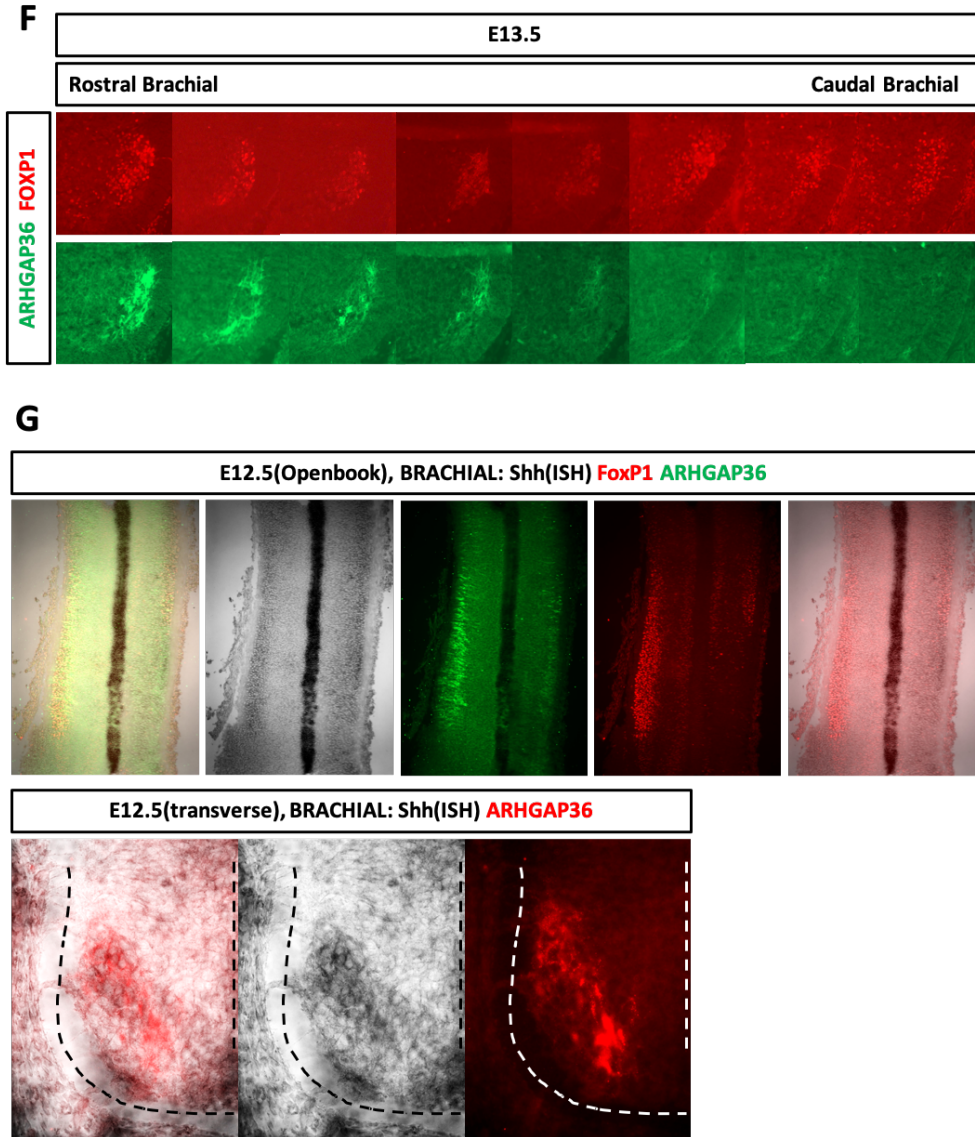


Figure 9. The temporal and spatial expression patterns of ARHGAP36

(A) Schematic of mouse ESC differentiation. RA and PURM were treated from day 2. (B) qPCR of Arhgap36 on days 0, 2, 4, and 6. Data are shown as the mean \pm s.d. (C) ISH of Arhgap36 in mouse embryos from E9.5 to E13.5. (D) IHC and ISH of

ARHGAP36, HB9, and FoxP1 in mouse embryo from E9.5 to E11.5 (E) IHC and ISH of ARHGAP36 and FoxP1 in mouse embryo E12.5 at different spinal cord levels. (F) IHC of ARHGAP36 and FoxP1 in mouse embryo E13.5 at brachial level through rostrocaudal axis. (G) Openbook and transverse IHC and ISH of Shh, ARHGAP36, and FoxP1 in mouse embryo E12.5 at brachial level. For C-G, n=4

3. Brachial level의 LMC에서 발현되어 FoxP1 단백질을 발현을 유지시키는 Shh

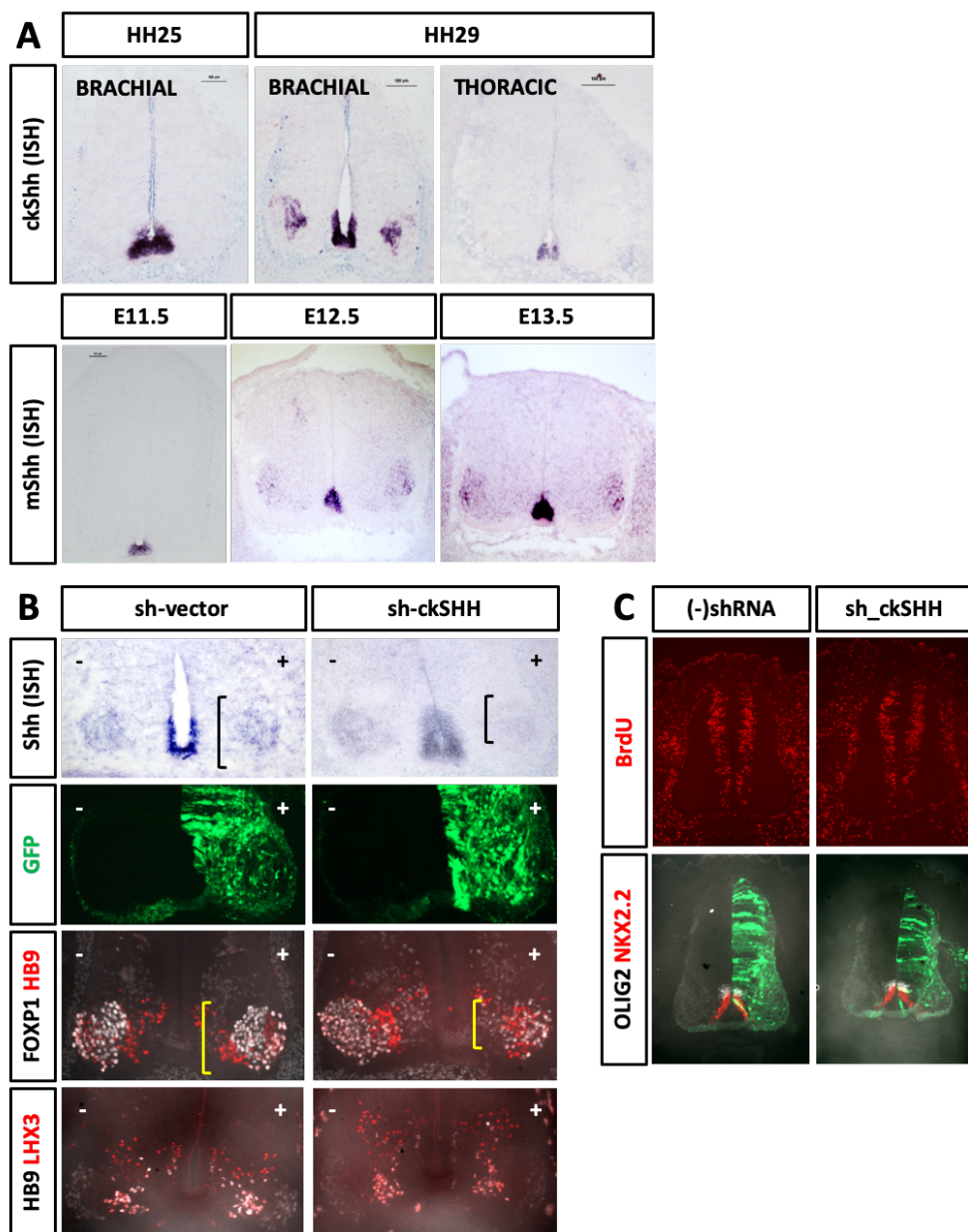
척수 발달의 초기 단계에서 Shh (Sonic Hedgehog)의 역할이 중요하다는 것은 매우 잘 알려진 사실이다 (Humke et al., 2010; Varjosalo & Taipale, 2008; Zeng et al., 2001). Notochord와 floor plate에서의 Shh발현은 GLI activator와 repressor가 척수의 배복 축을 따라 농도 구배를 형성하게 하고, 그로 인해 다양한 전사 인자가 출현하고 progenitor domain의 확립을 돕는다. 기존의 연구 결과에 따르면, chick embryo의 spinal cord에서도 Shh가 발현됨이 밝혀진 바 있다 (Oppenheim et al., 1999). 앞서 mouse embryo의 후기 단계에서 Shh가 운동 신경 세포의 일부에서도 발현 하는 것을 관찰하였다. 따라서 Shh가 운동 신경 발생에서 어떤 역할을 하는지 알아보기 위해 Shh의 발현 양상을 좀 더 구체적으로 살펴 보았다. Chick HH25에서 Shh mRNA 발현은 notochord와 floor plate로 제한되어 있었지만 좀 더 후기 단계인 HH29에서는 상완 수준의 LMC에서 발현되었다 (Figure 10A). Mouse embryo spinal cord의 경우도 chick embryo와 유사하게, 발달 초기 단계에 해당하는 E11.5에는 notochord와 floor plate에 Shh의 발현이 국한되어 있지만, E12.5부터 운동 신경에서도 발현 되기 시작하고, E13.5에는 LMC에 특이적으로 나타나는 것을 ISH를 통해 확인 할 수 있었다 (Figure 10A).

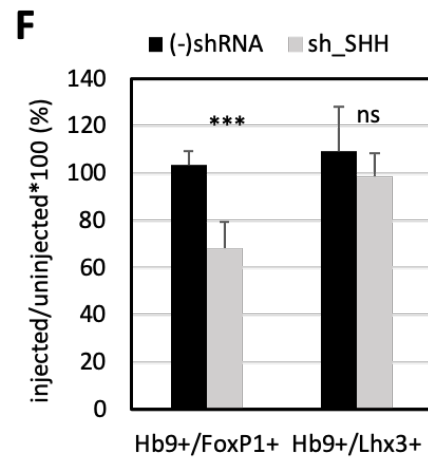
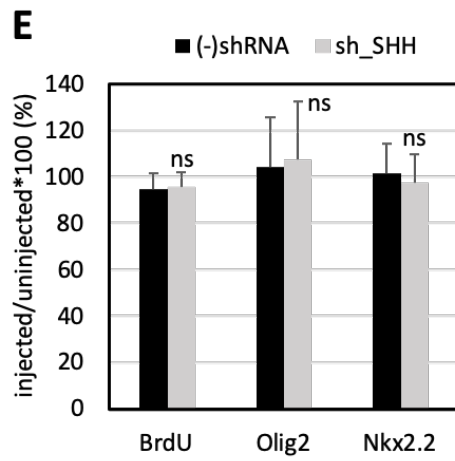
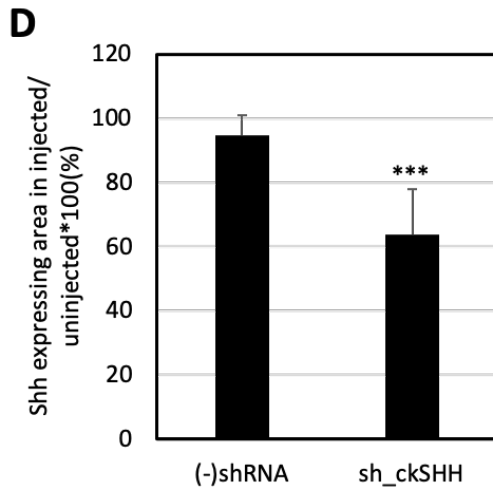
그렇다면, LMC에 존재하는 Shh의 역할을 알아보기 위해 chick Shh의 발

현을 특이적으로 감소 시킬 수 있는 shRNA knockdown construct를 제작했다. Chick embryo의 spinal cord에 in ovo electroporation을 통해 Shh shRNA주입한 결과, chick spinal cord의 주사 부위에서 Shh mRNA 양이 운동 신경에서만 감소된 것을 확인하였다 (Figure 10B and 10D). 감소한 Shh 양은 HH25에서 proliferation의 지표인 BrdU나 progenitor domain의 지표인 NKX2.2와 OLIG2의 발현에는 영향을 주지 않았다 (Figure 10C and 10E). Shh의 knockdown이 운동 신경에 어떠한 영향을 주었는지 알아보기 위해 관련 항체들로 IHC를 수행 해 본 결과, HB9+/FoxP1+ 한 cell (LMCI)은 유의미하게 감소하는 반면 ($p < 0.001$), HB9+/LHX3+ 한 cell (MMC)는 shRNA가 주입되지 않은 부분과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다 (Figure 10B and 10F). 따라서 Shh는 progenitor domain 경계를 설정하는 데 중요한 요소일 뿐만 아니라 FoxP1이 발현되는 LMC 형성에도 기여한다는 결론을 내릴 수 있다.

Shh의 필요성은 또한 mouse embryo에서도 확인할 수 있었다. Olig2 유전자의 promoter에 Cre recombinase를 연결함으로써 OLIG2가 발현되는 세포에서 Cre의 발현을 유도하는 시스템을 사용, Shh floxed mouse와의 교배를 통해 운동 신경에서 특이적으로 Shh의 발현하지 못하는 mouse 모델을 만들었다. Shhf/f;Olig2-Cre (Shh cKO) mouse embryo를 대조군과 비교했을 때 운동 신경에서 Shh가 조건적으로 감소한 것을 확인한 후, chick embryo

spinal cord와 유사한 표현형을 보이는지 IHC를 통해 관찰했다. E12.5 Shh cKO에서 FoxP1 발현 양이 30% 가량 감소한 반면 ($p < 0.0001$), HB9+/LHX3+ 한 MMC는 유의한 차이를 보이지 않았다. Shh cKO과 대조군의 또 다른 현저한 차이점은 brachial level의 LMC에서 Shh pathway의 하위 인자인 ARHGAP36의 발현 양이 감소한 것이다 (Figure 5E, F). 따라서 brachial LMC에서 발현되는 Shh는 FoxP1+ LMC 신경이 유지되는데 중요하고, 이러한 현상은 Shh signal를 하위 인자인 ARHGAP36가 매개할 것이라고 추측할 수 있다.





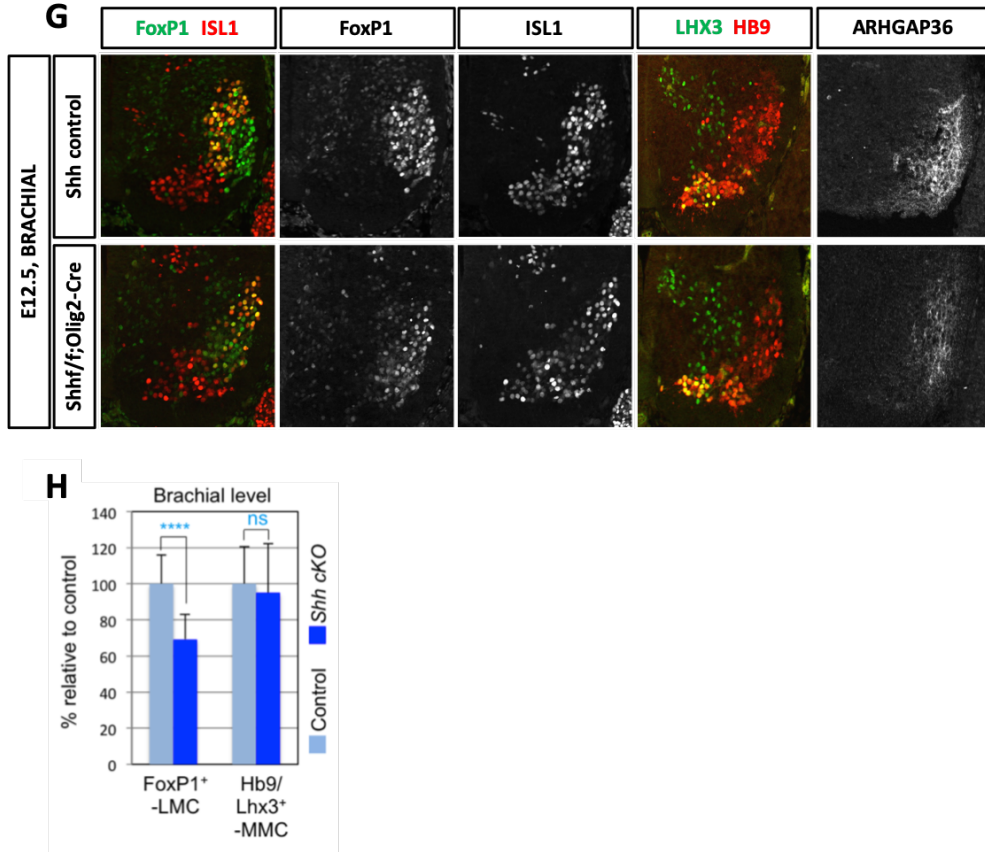


Figure 10. The expression patterns of Shh in the spinal motor neurons and their functions

(A) Up: ISH of Shh in chick embryos HH25 and HH29, brachial and thoracic. Down: ISH of Shh in mouse embryos from E11.5 to E13.5. (B) In ovo electroporation of shRNA negative control (sh-vector) and chick SHH specific shRNA (sh-ckSHH) and IHC of HB9/FoxP1 and HB9/LHX3 at HH29. (C) In ovo electroporation of shRNA negative control (sh-vector) and chick SHH specific shRNA (sh-ckSHH) and IHC of BrdU, NKX2.2, and OLIG2 at HH25 (D) Quantitative data showing Shh knockdown

efficiency. (E) Quantitative data of BrdU, NKX2.2, and OLIG2 at HH25. (F) Quantitative data of HB9+/FoxP1+ (LMC) or HB9+/LHX3+ (MMC) cells in shRNA injected side relative to uninjected side at HH29. (G) IHC of FoxP1, ISL1, LHX3, HB9, and ARHGAP36 in brachial level of mouse E12.5 Shh control and cKO. (H) Quantification of FoxP1+ (LMC) and HB9+/LHX3+ (MMC) cells in brachial level of mouse E12.5 Shh control and cKO. For A, n=3. For C-F, n=3 with at least 10 images for each construct were quantified. For G and H, n=3 and the data are from OHSU. Data are shown as the mean \pm s.d. (**** p<0.0001, *** p<0.001, ns not significant)

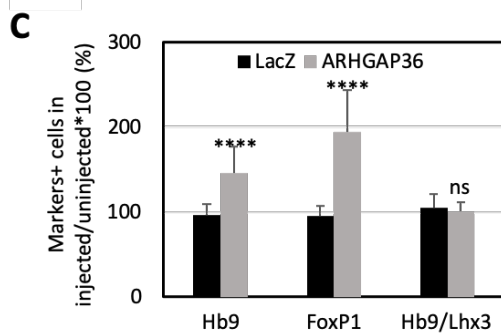
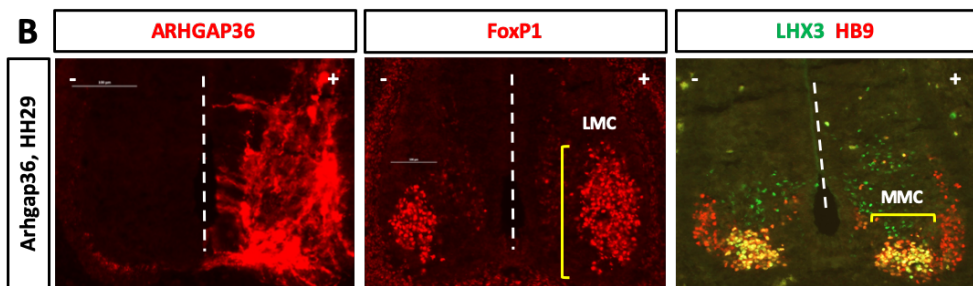
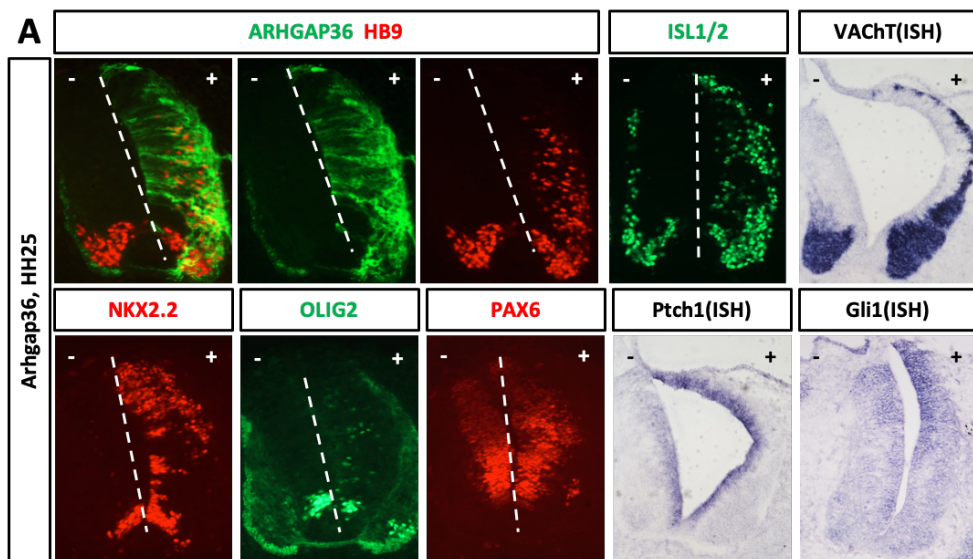
4. Spinal cord에서 Shh signal을 중재하고 활성화 시키는 ARHGAP36

Embryo spinal cord 에서 발현되는 ARHGAP36 의 기능을 알아보기 위해, in ovo electroporation 을 통해 ARHGAP36 를 과발현 시킬 수 있는 construct 를 chick embryo spinal cord 에 주입했다. HH25 의 chick embryo 의 경우 ARHGAP36 가 주입되지 않은 쪽과 비교했을 때, ARHGAP36 가 과발현 된 부분에서 Shh 의 하위 표적 유전자인 Ptch1 과 Gli1 의 전사가 증진되는 것을 확인했고, 그로 인해 NKX2.2, OLIG2 및 PAX6 와 같이 운동 신경의 progenitor domain 형성에 중요한 지표들이 원래의 발현 위치가 아닌 곳에서 발현되거나 그 수가 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 운동 신경의 지표들인 HB9, ISL1/2 및 VACHT (vesicular acetylcholine transporter)를 증가시켰다 (Figure 11A). 또한 운동 신경이 더 분화된 시점인 HH29 에서 LMC 와 MMC 의 지표인 FoxP1 과 HB9/LHX3 의 발현 양을 관찰 해 본 결과, FoxP1+ 한 세포의 수는 유의미하게 증가한 반면, HB9+/LHX3+ 한 세포의 수는 변화가 확인되지 않았다 (Figure 11B). 그렇다면 실제로 ARHGAP36 가 Shh pathway 를 매개할 수 있는지 확인해 보기 위해 ARHGAP36 가 brachial 뿐만 아니라 thoracic 과 lumbar level 에서도 Shh pathway 를 활성화시켜 HB9 또는 FOXP1 형성을 촉진 시킬 수 있는지 확인해 보았다. ARHGAP36 의

과발현이 HB9+ 또는 FOXP1+ 한 세포들을 증가시킴을 관찰했다 (Figure 11C). 따라서, ARHGAP36 가 Shh pathway 를 활성화시킬 수 있고, Shh pathway 의 양성 조절 자임을 예측할 수 있었다 (Figure 11D).

앞서 chick embryo spinal cord 에서 Shh 활성화의 필요성을 확인했으므로, 그 하위 인자인 Arhgap36 의 결실이 mouse embryo spinal cord 에서 FoxP1+ 세포와 LMC 의 형성에 유사한 영향을 주는지 알아보기로 했다. CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 Arhgap36 exon2 의 7 개 염기 서열 (CTCGTGG)이 결실된 Arhgap36 knockout mouse 모델을 얻을 수 있었다 (Figure 12A). 첫째로, ARHGAP36 항체를 이용한 IHC 로 Arhgap36 null mouse 의 embryo spinal cord 에서 ARHGAP36 가 발현되지 않는 것을 확인했다. 다음으로, 대조군 mouse embryo 의 brachial level 에서 강하게 발현되는 FoxP1 의 수가 일정 수준을 유지하는 반면, Arhgap36 knockout embryo 의 경우 상당한 감소 수준을 보여 주었다 ($p < 0.0001$). 이것이 신체 부위의 차이 때문이 아니라는 것을 보이기 위해, brachial level 의 LMC 를 10 개의 cryosection 을 통해 검사했고, 모든 section 에서 FoxP1+ cell 의 감소를 확인할 수 있었다. 반면, HB9+/LHX3+로 표시되는 brachial level 의 MMC 신경 세포 수는 대조군과 비교했을 때 유의미한 차이를 보이지 않았다 (Figure 12B and 12D). Thoracic level 에서의 FoxP1(low)+/ISL1+로 표지 되는 PGC, HB9+/ISL1+로 표지 되는 HMC,

HB9+/LHX3+ MMC 도 Arhgap36 결실에 의한 변화를 보이지 않았다 (Figure 12C and 12D). 다시 말해, Arhgap36 knockout embryo 에서도 Shh cKO 과 마찬가지로 LMC 신경 세포가 감소함을 확인함으로써 Shh pathway 와 그 하위 인자인 ARHGAP36 가 LMC 신경 세포의 형성에 중요하다고 결론 지을 수 있다.



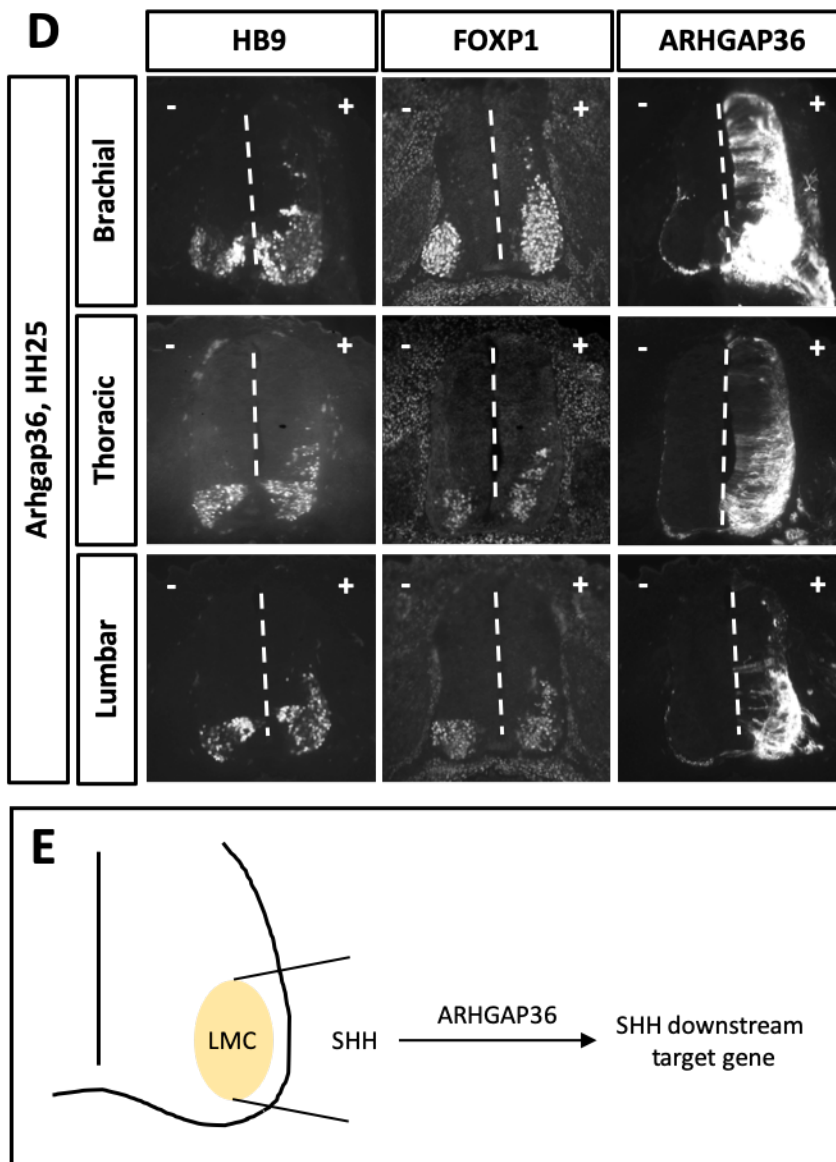


Figure 11. Overexpression of ARHGAP36 in spinal motor neurons

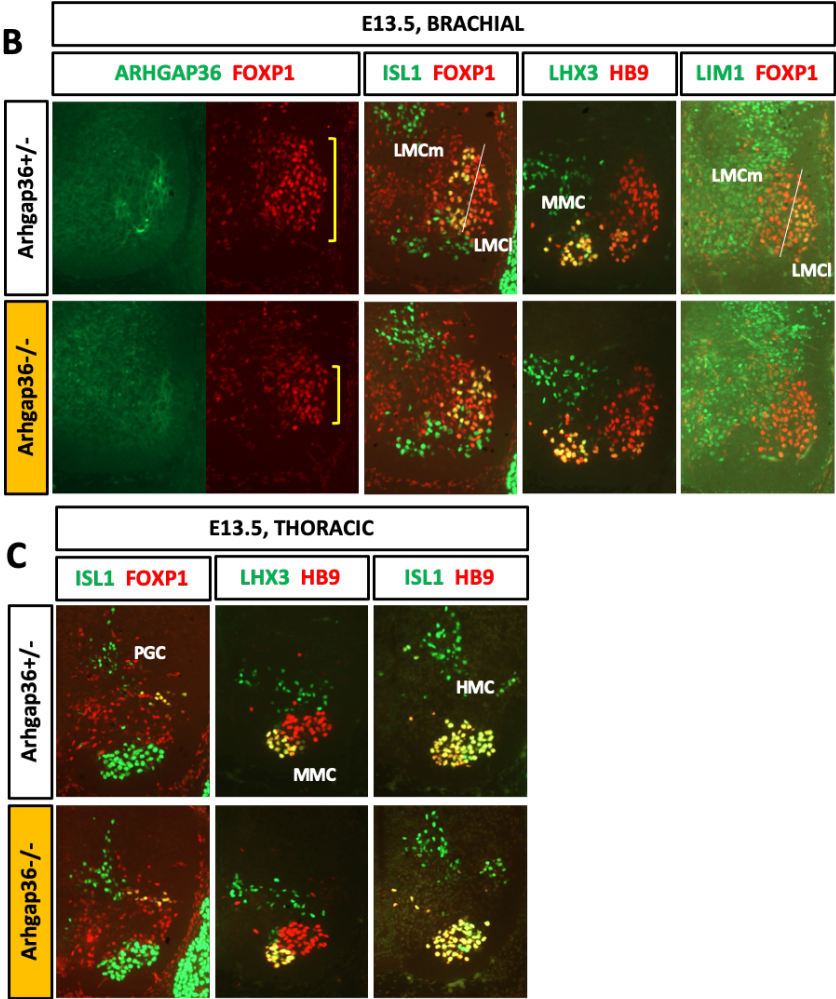
(A) In ovo electroporation of Arhgap36 (to confirm expression of the construct) and ISH of Shh downstream targets (Ptch1 and Gli1), IHC of progenitor domain (pMN)

markers (NKX2.2, OLIG2, and PAX6) and motor neuron markers (HB9, ISL1/2, and VACHT) at chick HH25 (B) In ovo electroporation of Arhgap36 and IHC of ARHGAP36 (to confirm expression of the construct) and each columnar markers. FoxP1 for LMC and HB9+/LHX3+ for MMC. (C) Quantification of FoxP1+ (LMC) and HB9+/LHX3+ (MMC) cells in brachial level of Arhgap36 injected chick embryos. (D) In ovo electroporation of Arhgap36 and IHC of motor neuron markers (HB9 and FoxP1) at different spinal cord level. (E) Schematic illustration of Shh expressed in LMC activates transcription of its downstream target genes through ARHGAP36. For A, B, and D, n=5. For C, data are shown as the mean \pm s.d. (**** p<0.0001, *** p<0.001, ns not significant)

A *Arhgap36* exon2 targeted

WT :
5' AGCGCCTGAAGCTGCAAGA **GACTGCTTACCACGAACTCGTGG** CCAGACATTTCCTCTCTGAATT 3'

MT :
5' AGCGCCTGAAGCTGCAAGA **GACTGCTTACCACGAA - - - - -** CCAGACATTTCCTCTCTGAATT 3'



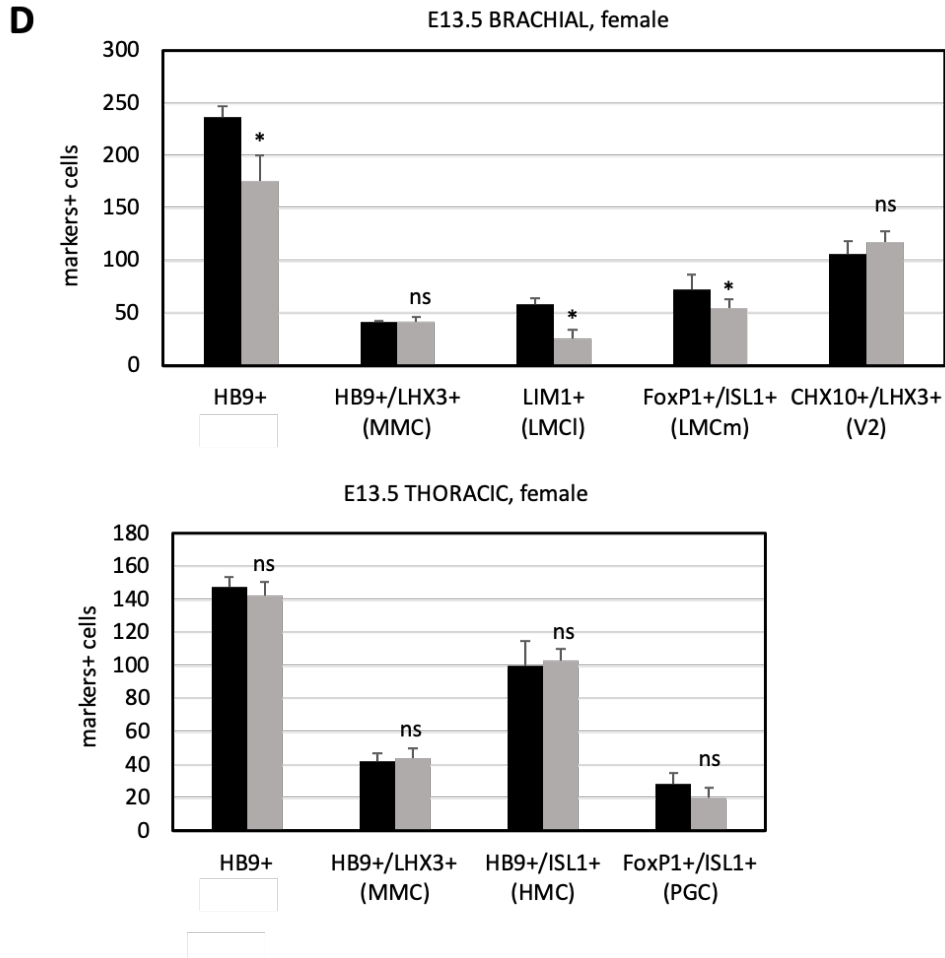


Figure 12. Arhgap36 knockout embryos show defects in maintaining LMC neurons

(A) Arhgap36 KO mouse generation using CRISPR/Cas9. sgRNA targets and deleted 7 basepairs of Arhgap36 exon2. (B) IHC of ARHGAP36 (to confirm deletion of the gene), FoxP1/ISL1 (LMCm), FoxP1/LIM1 (LMCI), and HB9/LHX3 (MMC) in brachial levels of Arhgap36 hetero and KO embryos at E13.5. (C) IHC of

FoxP1/ISL1 (PGC), HB9/LHX3 (MMC) ISL1/HB9 (HMC) in thoracic levels of Arhgap36 hetero and KO embryos at E13.5. (D) Quantitative data of each columnar cell population in Arhgap36 hetero and KO embryos at E13.5 For B-C, n=5 each. Data are shown as the mean \pm s.d. (* p<0.05, ns not significant)

5. AKT를 통한 ARHGAP36의 단백질 안정화

다음으로 Shh pathway 내에서 ARHGAP36가 어느 단계에 위치 하는지 알아보았다. AKT는 PKA의 kinase 활성을 억제함으로써 Shh pathway를 촉진시키는 양성 인자로 보고되어 있다 (James Briscoe & Thérond, 2013; Eccles et al., 2016; Niewiadomski et al., 2014; Rack et al., 2014; Riobó et al., 2006). 따라서 ARHGAP36가 AKT와 PKA 사이의 매개체라고 추측했다. 이를 시험하기 위해 IP를 통해 ARHGAP36와 AKT WT 사이에 상호작용이 존재하는 것을 확인할 수 있었고 AKT CA와 ARHGAP36 사이의 상호 작용은 AKT WT과 ARHGAP36의 그것에 비해 강하였다 (Figure 13A). 이것은 active form의 AKT가 ARHGAP36와의 interaction을 통해 ARHGAP36의 인산화를 야기할 수 있는 가능성을 보여준다. 한편, AKT 저해제 (iAKT)는 AKT WT의 pleckstrin homology domain을 통해 AKT의 활성을 억제시키는데, 이 약물을 처리한 결과 두 단백질 사이의 작용이 감소함을 볼 수 있었다 (Figure 13B).

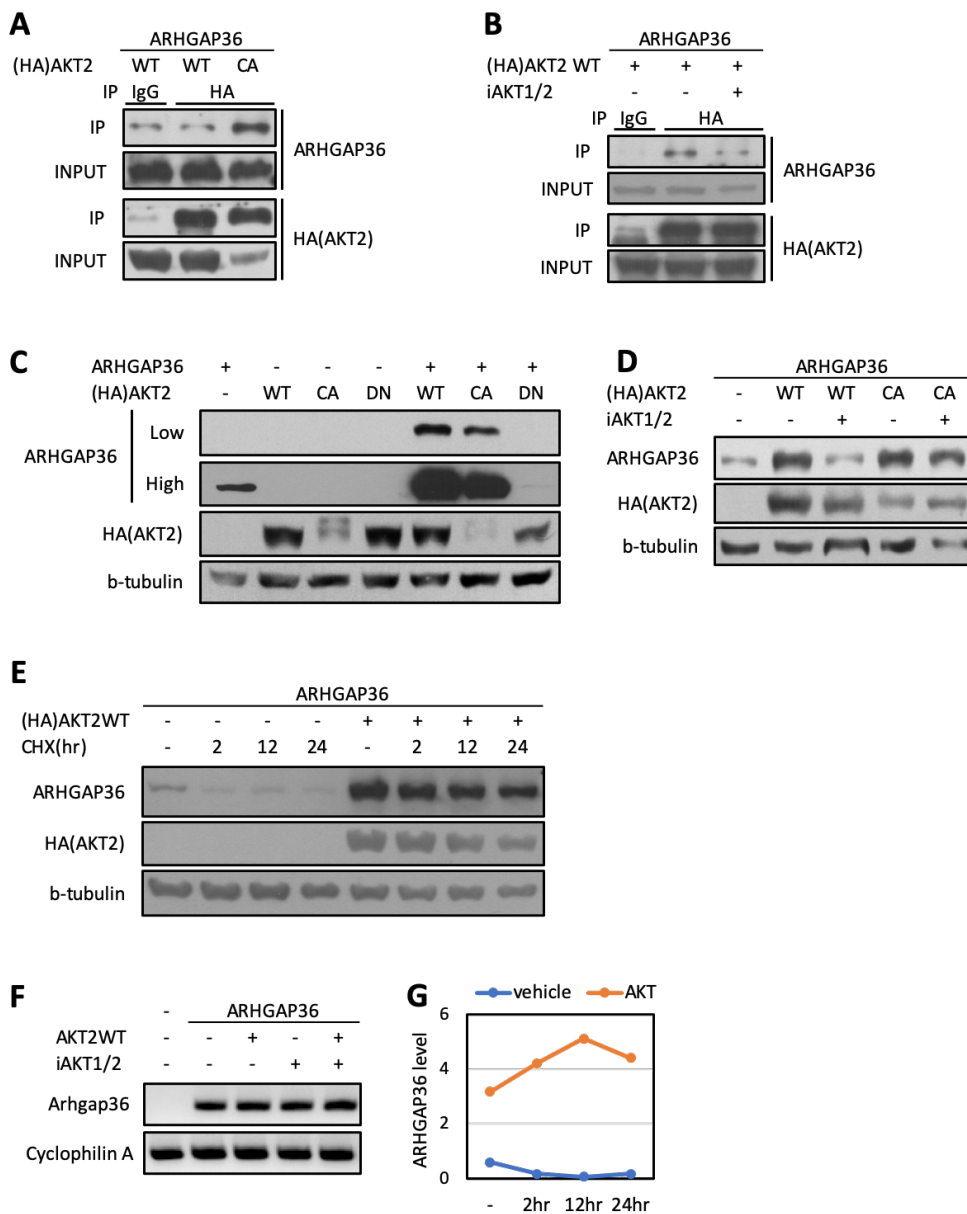
HEK293T cell에 ARHGAP36를 여러 형태의 AKT와 함께 과발현 시켰다. Western blot을 통해 확인해 본 결과, ARHGAP36는 단독으로 발현되었을 때에 비해 AKT wildtype (WT)과 constitutively active (CA) 형태는 ARHGAP36 단백질 양을 증가 시켰지만 dominant negative (DN) 형태는 그렇지 못했다 (Figure 13C). iAKT를 처리했을 때, ARHGAP36 단백질 양을

기저 수준으로 유지시켰다. 그러나, AKT CA는 iAKT에 내성을 갖고 있어 ARHGAP36 단백질이 증가된 상태를 유지하였다 (Figure 13D).

그렇다면 AKT가 ARHGAP36의 transcription을 유도하여 단백질 양이 증가하는지 아니면 실제로 안정성을 향상시키는지 확인해 보았다. HEK293T cell에 ARHGAP36와 AKT를 transfection 시킨 후, cycloheximide (CHX)를 처리하여 새로운 단백질의 합성을 억제했다. ARHGAP36만 transfection 시킨 경우, CHX가 translation을 억제하기 때문에 일정 시간이 지나면 ARHGAP36 단백질 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 AKT WT와 함께 transfection 시켰을 때, ARHGAP36 단백질 수준은 CHX를 처리했을 때에도 감소하지 않고 일정하게 유지되었다. 이는 증가된 ARHGAP36의 단백질 양이 transcription의 증가로 인한 것일 가능성을 배제 하고 AKT WT이 ARHGAP36의 단백질 안정성을 조절함을 보여준다 (Figure 13E and 13G). 마찬가지로 AKT가 Arhgap36의 transcription에 영향을 주는지 알아보기 위해 AKT의 존재 유무와 iAKT 처리 여부에 따라 Arhgap36 mRNA 수준을 RT-PCR을 통해서 확인해 본 결과, Arhgap36 transcription 수준은 차이가 없는 것을 다시 한번 확인 할 수 있었다 (Figure 13F).

또한 mESC를 운동 신경으로 분화 시키는 조건 하에서 iAKT의 효과를 시험해 보았다 (Figure 13H). 분화 후 4일 쯤부터 iAKT를 처리했을 때

HB9과 ARHGAP36의 단백질 양이 감소했다 (Figure 13J and 13K). 하지만 앞의 결과와 마찬가지로 iAKT로 인한 Arhgap36 mRNA 수준의 변화는 관찰할 수 없었다 (Figure 13I). 따라서 AKT를 통한 ARHGAP36의 안정화가 운동 신경으로 분화 될 때 필수적인 단계임을 추론 할 수 있었다.



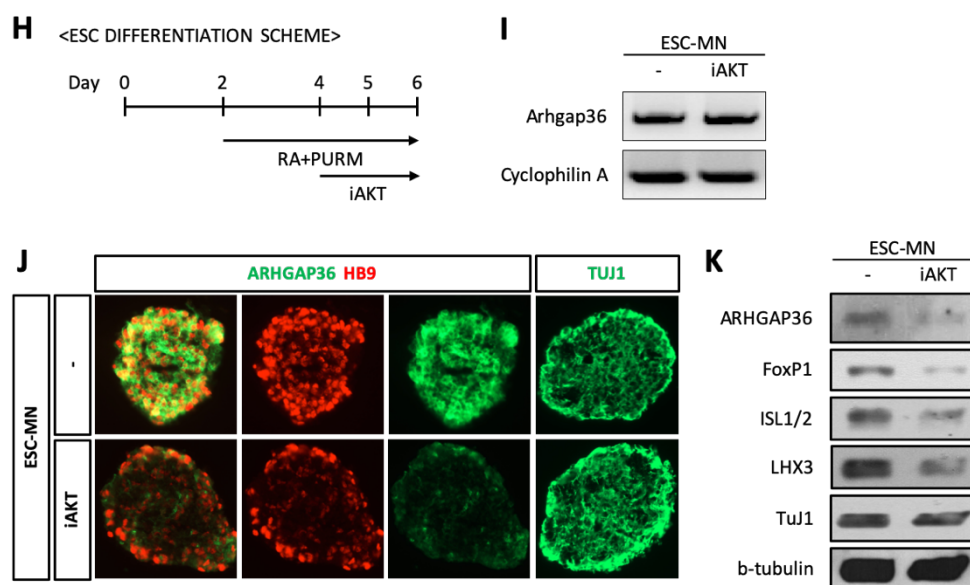


Figure 13. AKT stabilizes ARHGAP36

(A) IP against HA (AKT) and western blot with ARHGAP36 with HEK293T cells transfected with ARHGAP36 and AKT WT/CA. (B) IP against HA (AKT) and western blot with ARHGAP36 with HEK293T cells transfected with ARHGAP36 and AKT WT with or without iAKT1/2 treatment. (C) Western blot of ARHGAP36 with different forms of AKT (WT, CA, DN) in HEK293T cells. (D) Western blot of ARHGAP36 with AKT WT and CA in HEK293T cells under iAKT1/2 treatment for 20 hours prior to harvest. (E) Western blot of ARHGAP36 with or without AKT WT in HEK293T cells under CHX treatment for 2, 12, and 24 hours prior to harvest (F) Quantification data of ARHGAP36 protein levels with or without AKT WT in HEK293T cells under CHX treatment for 2, 12, and 24 hours. Band intensity were measured with ImageJ. (G) RT-PCR of Arhgap36 with or without AKT WT in

HEK293T cells under iAKT1/2 treatment. (H) Mouse ESC differentiation scheme. iAKT1/2 treatment started on day 4. (I) RT-PCR of Arhgap36 in mouse ESC differentiated into motor neurons with or without iAKT1/2 treatment. (J) IHC of ARHGAP36, HB9, and TuJ1 in mouse ESC differentiated into motor neurons with or without iAKT1/2 treatment. (K) Western blot of ARHGAP36 and different motor neuron markers in mouse ESC differentiated into motor neurons with or without iAKT1/2 treatment. For A-D and H-K, n=3; E-G, n=2.

6. LMC의 발달에 중요한 인자인 AKT와 Shh

앞서 살펴 본 결과에서 ARHGAP36의 발현은 mouse spinal cord의 LMC에 국한 되어 있고, AKT와 Shh는 ARHGAP36과 밀접한 관련이 있으므로 LMC에서의 AKT 발현을 살펴볼 필요가 있었다. E13.5 mouse 척수를 ISH를 통해 살펴 본 결과, Akt1, Akt2 및 Akt3 모두 ARHGAP36의 발현 양상과 유사하게 LMC에서 발현되어 있었다 (Figure 14A). 즉, 활성화 된 Shh pathway가 AKT를 통해 ARHGAP36의 안정화를 유도하고 이 과정이 발달 중인 embryo spinal cord에서 LMC 신경을 유지하는데 필수적이라고 생각했다. 실제로 embryo의 LMC에서 이러한 기작을 통해 LMC가 유지되는지 알아 보고자 하였다. Chick embryo spinal cord에서 AKT WT 및 CA의 과발현은 LacZ가 주입 된 대조군 (Figure 14B and 14D)과 비교 하였을 때 FoxP1을 발현하는 cell의 수를 약 1.5-2.0 배 가량 증가시켰다. 한편, AKT2 DN은 FoxP1을 발현하는 cell 수를 유의성 있게 감소 시켰지만 ($p < 0.01$), ARHGAP36가 같이 주입되며 FoxP1을 발현하는 세포 수가 원래대로 되돌아 오는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 14C and 14D). 따라서 spinal cord의 운동 신경에 발현되는 Shh는 AKT와 ARHGAP36를 매개체로 이용하여 FoxP1+ 한 LMC 신경의 유지한다고 추측할 수 있다.

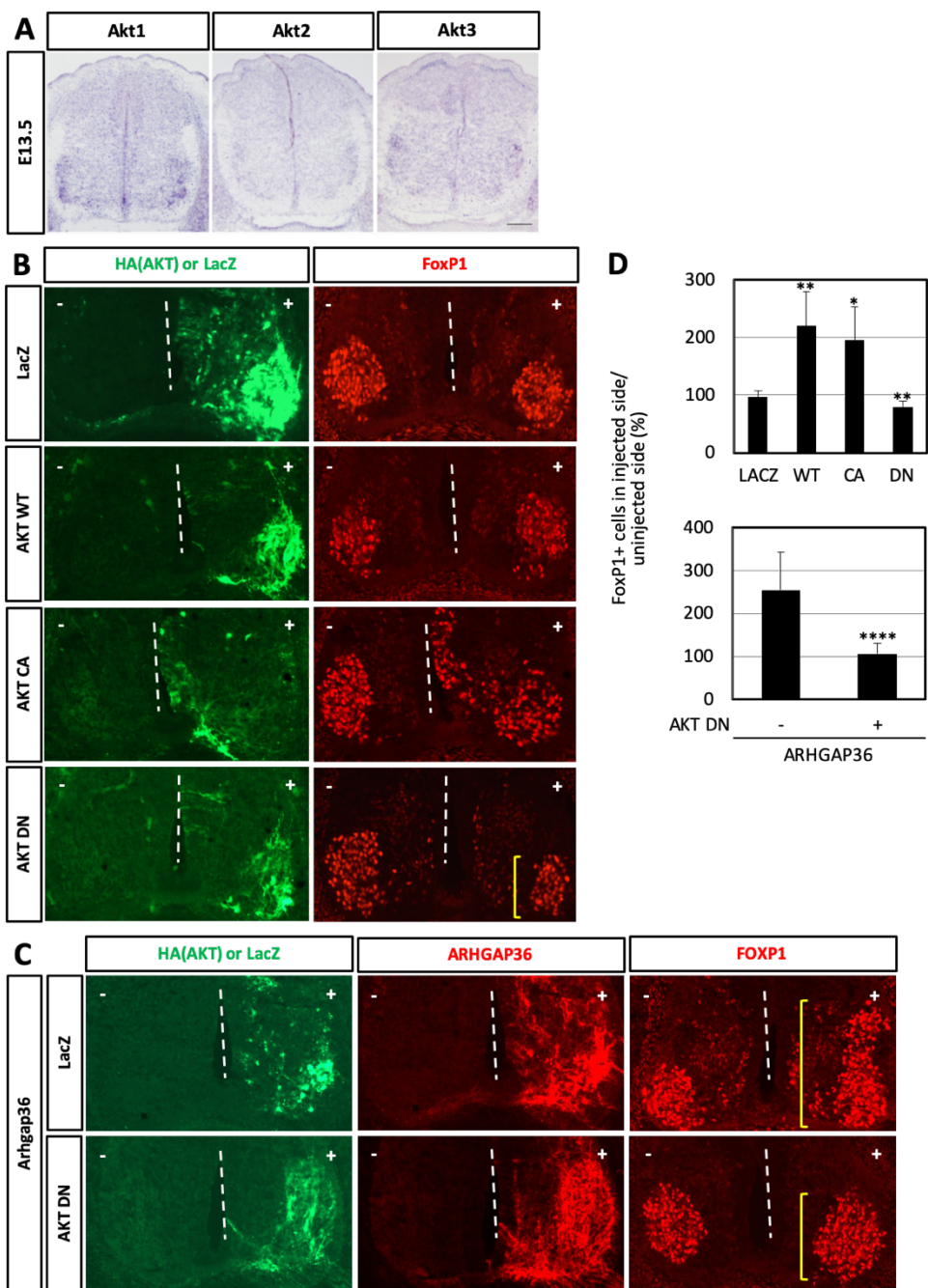


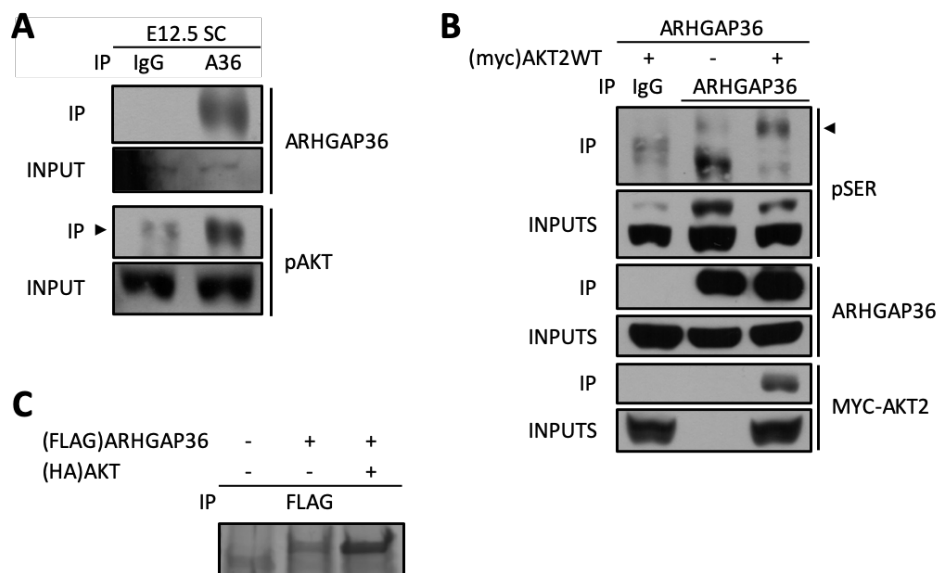
Figure 14. AKT expressed in spinal motor neurons contributes to LMC specification

(A) ISH of Akt mRNA in mouse E13.5 spinal cord. (B) In ovo electroporation of AKT WT, CA, DN constructs and IHC of LMC marker, FoxP1 at chick HH29. (C) In ovo electroporation of Arhgap36 with or without AKT DN and IHC of FoxP1. (D) Quantification data of FoxP1+ cells in injected side relative to uninjected side of B and C. For A-C, n=3. For D, at least 10 images were quantified per group. Data are shown as the mean \pm s.d. (* p<0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001)

7. ARHGAP36의 인산화를 유도하는 AKT

AKT는 잘 알려진 kinase로서 PI3K에 의해 생성된 PtdINs(3,4,5)P3 (PIP3)와의 결합과 T308, S473의 인산화를 통해 activation 된다고 알려져 있다 (Vivanco & Sawyers, 2002). 따라서 앞서 보였던 ARHGAP36와 AKT 사이의 상호 작용을 통해 AKT가 ARHGAP36의 인산화를 유도하여 단백질 안정화에 기여할 것이라고 추측했다. 이를 확인하기 위해 mouse E12.5 embryo의 spinal cord를 분리해 ARHGAP36 항체로 IP 한 후, AKT의 activated 형태를 detection 할 수 있는 p-AKT 항체를 이용해 western blot으로 확인했다. Mouse embryo spinal cord에 발현되어 있는 endogenous ARHGAP36는 p-AKT와 상호 작용하고 있음을 관찰했다 (Figure 15A). 또한 HEK293T cell에서 AKT가 존재할 때, ARHGAP36의 serine 잔기가 인산화 되는 것을 확인했다 (Figure 15B). 질량 분석기를 통해 알아낸 ARHGAP36의 인산화 잔기 후보들 중 (Figure 15C and 15D) 21번과 432번 serine 잔기를 alanine으로 mutation 시켜 AKT에 의한 인산화를 방지하면, AKT에 의한 ARHGAP36의 인산화가 감소하는 것을 IP를 통해 관찰할 수 있었고 (Figure 15E), ARHGAP36 WT에서 보였던 단백질의 안정화가 사라지는 것을 western blot을 통해 알 수 있었다 (Figure 15F). 또한 S21A, S432A를 chick embryo spinal cord에 in ovo electroporation을 통해 주입시켰을 때, ARHGAP36 WT에서 보이던 FoxP1+한 LMC 신경의 증가를 관찰할 수 없었다 (Figure 15G)

and 15H). 따라서 activation 된 AKT가 ARHGAP36의 21번, 432번 serine 잔기를 인산화 시켜 안정화를 유도할 것이라고 유추하였다 (Figure 15I).



D LC MS/MS

Position	Peptide	Modification Type	Modification Peptide Score
21	R.RVSVLGGAPGQNSDR.S	phosphorylation	62 >> 72
50	R.LKLQETAYHELVAR.H	ubiquitination	23 >> 34
97	R.AASLKTFGIRLEEVLVNELTR.R	ub >> phospho	23 >> 27
215	R.KMSLNPIAQQIPQIVETCCK.F	phosphorylation	0 >> 22
390	R.KTKLGIDHYVASVNVVR.A	ubiquitination	0 >> 33
432	R.VWKSSPEALDFIR.R	phosphorylation	0 >> 57

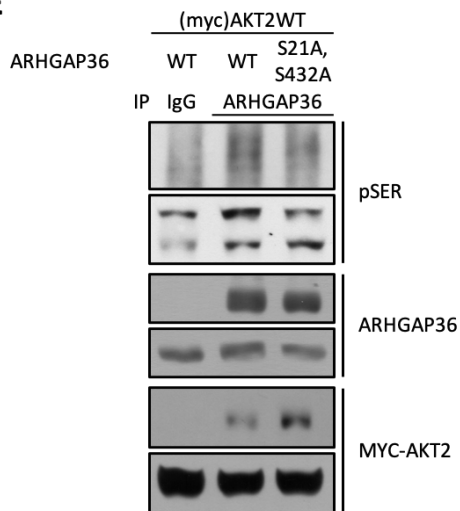
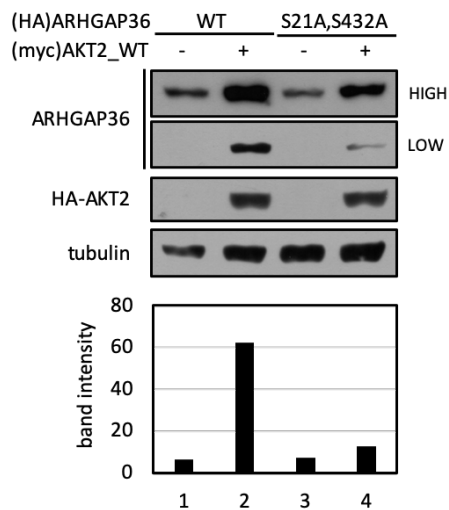
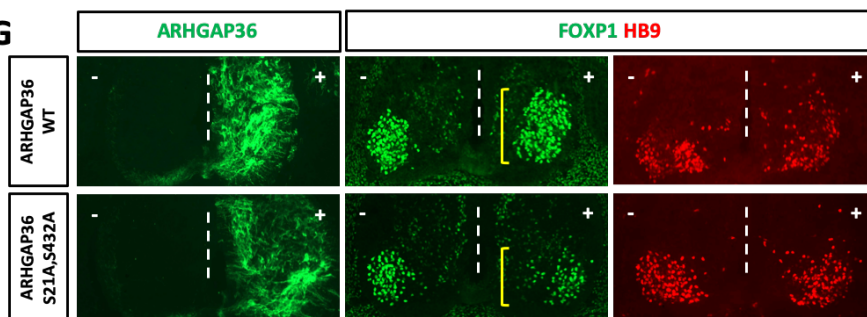
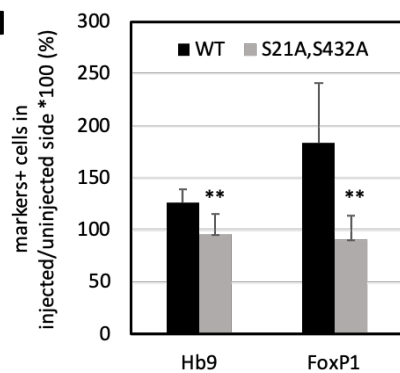
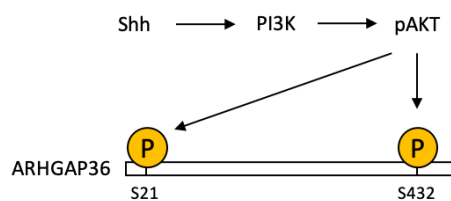
E**F****G****H****I**

Figure 15. Activated AKT phosphorylates ARHGAP36 and induces stabilization

(A) IP of ARHGAP36 in mouse E12.5 spinal cord and western blot with p-AKT. (B) IP of ARHGAP36 in HEK293T cells transfected with or without AKT. Then western blot of p-SER. (C) IP of ARHGAP36 in HEK293T cells transfected with either ARHGAP36 and/or AKT. (D) LC MS/MS results showing modification target sites in ARHGAP36 by AKT2. (E) IP of ARHGAP36 WT or S21A, S432A with AKT in HEK293T cells. Then western blot of pSER. (F) Up: Western blot of ARHGAP36 in HEK293T cells transfected with Arhgap36 WT or S21A, S432A constructs with or without AKT. Down: Quantification data of band intensity. (G) In ovo electroporation of Arhgap36 WT or S21A, S432A and IHC of motor neuron markers, FoxP1 and HB9. (H) Quantification data showing HB9⁺ or FoxP1⁺ cells in the injected side compared to uninjected side of G. (I) Illustration of how Shh can activate AKT, which leads to ARHGAP36 phosphorylation and stabilization. For A, B, E, and F, n=3. For G, at least 10 images were quantified per group. Data are shown as the mean \pm s.d. (** p<0.01)

8. PKA의 kinase activity를 억제 시키는 ARHGAP36

PKA kinase activity는 AKT (Riobó et al., 2006)와 ARHGAP36 (Eccles et al., 2016)에 의해 PKA의 kinase activity가 억제된다는 기존의 연구 결과를 토대로 Shh pathway의 negative regulator인 PKA에 ARHGAP36가 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. PKA는 kinase로 잘 알려져 있는 단백질인데, HEK293T cell에서 PKA만 transfection 시킨 경우와 비교했을 때, Arhgap36를 transfection 시키면 western blot을 통해 총 pSER의 양과 PKA의 단백질 양이 감소함을 관찰 할 수 있었다 (Figure 16A). 즉, PKA의 과발현으로 인해 cell 내에 존재하는 여러 단백질들의 인산화가 촉진되어 pSER이 증가하지만, ARHGAP36가 PKA의 degradation을 유도하여 kinase activity를 억제시켜 pSER이 감소한다고 해석할 수 있다. 이는 ARHGAP36가 PKAC의 lysosomal degradation을 촉진시킨다는 기존의 연구 결과와 일치 한다 (Eccles et al., 2016). 또 PKA는 CREB를 인산화 시켜 CRE와의 결합을 촉진시키는 것으로 알려져 있기 때문에 CRE-LUC을 이용한 luciferase reporter assay를 통해 ARHGAP36가 PKA의 kinase activity를 억제 시키는지 다시 한 번 확인해 보고자 하였다. 알려진 바와 같이 PKA가 있는 환경에서는 CREB가 인산화 되어 CRE에 결합, 연결되어 있는 luciferase의 활성을 촉진시키는 반면, ARHGAP36와 PKA가 같이 존재하는 환경에서는 CREB 인산화를 ARHGAP36가 억제하여 reporter의 활성을 감소시켰다

(Figure 16B). IP를 이용한 결과, PKA의 촉매 부위와 ARHGAP36는 상호작용을 보이는 반면, 촉매 작용을 할 수 없게 mutation 시킨 PKA K73H와는 그렇지 않았다 (Figure 16C).

그렇다면, chick embryo의 spinal cord에서 또한 이러한 현상이 일어나는지 알아보기 위해 in ovo electroporation을 시행해 본 결과, PKA가 Shh pathway를 차단하는 negative regulator로 알려진 것처럼, PKA만 주입된 경우, HB9+ 한 운동 신경의 수가 감소하였다. 그러나 ARHGAP36가 PKA와 함께 주입되면, 주입하지 않은 spinal cord 부분에 비해 HB9+ 한 운동 신경의 수가 복구되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 16D). 이것은 ARHGAP36가 PKA의 kinase 활성을 억제함으로써 Shh pathway의 양성 인자로 작용할 수 있음을 보여준다.

이전의 연구 결과들에 따르면 PKA가 GLI 단백질의 인산화를 유도함으로써 Shh 경로를 어떻게 억제하는지 보고되어 있다 (Niewiadowski et al., 2014). Doxycycline (Dox) 처리를 통해 ARHGAP36를 과발현 시킬 수 있는 inducible mESC를 사용하여 운동 신경으로의 분화를 유도한 후, PKA의 활성을 증진시킬 수 있는 Forskolin을 처리하였을 때 GLI3의 발현 양 변화를 살펴보았다. Forskolin의 처리로 인해 Shh의 하위 인자인 GLI3의 repressor 형태가 증가한 반면, Dox를 이용해 ARHGAP36가 과발현 되었을 때 GLI3 repressor가 기저 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있다 (Figure

16E).

따라서 활성화된 AKT가 ARHGAP36의 S21과 S432를 인산화 시켜 ARHGAP36 단백질의 안정화를 유도하면 운동 신경 내에 증가한 ARHGAP36가 interaction을 통해 PKA로 하여금 GLI 단백질을 인산화시키는 것을 방지하고 Shh pathway에서 양성 인자로 기능한다고 결론 지을 수 있다 (Figure 16F).

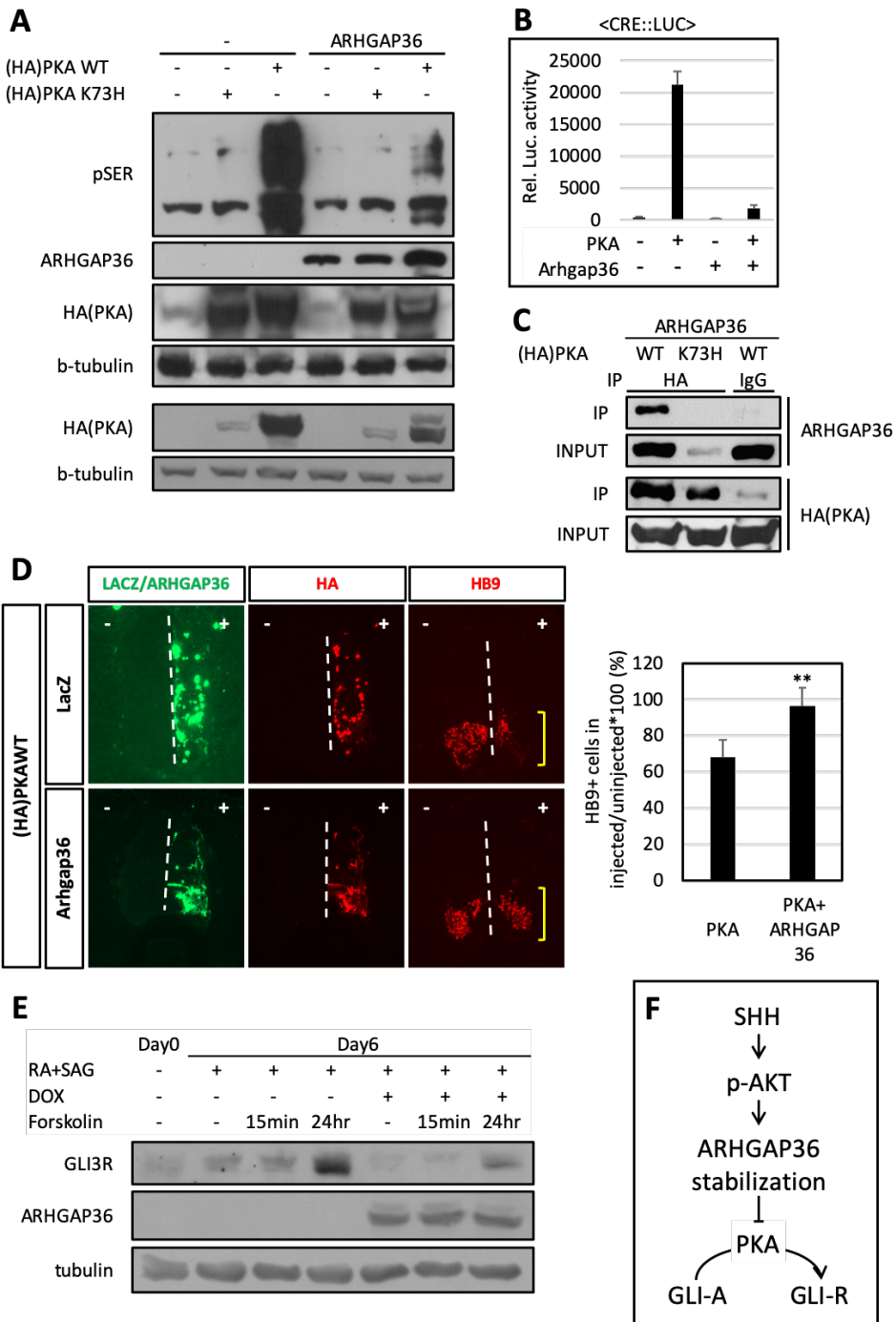


Figure 16. ARHGAP36 inhibits PKA kinase activity

(A) Western blot of pSER in HEK293T cells transfected with PKA and/or ARHGAP36. (B) Luciferase reporter assay of CRE-LUC in P19 cell transfected with PKA and/or ARHGAP36. (C) In ovo electroporation of PKA and/or ARHGAP36 and immunohistochemistry of HB9 to observe motor neurons formation. (D) Immunoprecipitation assay against HA(PKA) and western blot with ARHGAP36 in HEK293T cells. (E) Inducible mouse ESC was differentiated to motor neuron. Forskolin was treated for 15 minutes or 24 hours prior to harvest. ARHGAP36 was overexpressed with Dox treatment. For A-D, n=4. For B, data are shown as the mean \pm s.d (F) Proposed model for Shh pathway and ARHGAP36 in LMC neuron. In the presence of Shh, AKT is activated (Riobó et al., 2006). p-AKT then phosphorylates probably S21 and S432 in ARHGAP36 and leads to ARHGAP36 protein stabilization. Abundant ARHGAP36 is capable of blocking PKA kinase activity which is responsible for producing GLI repressor forms.

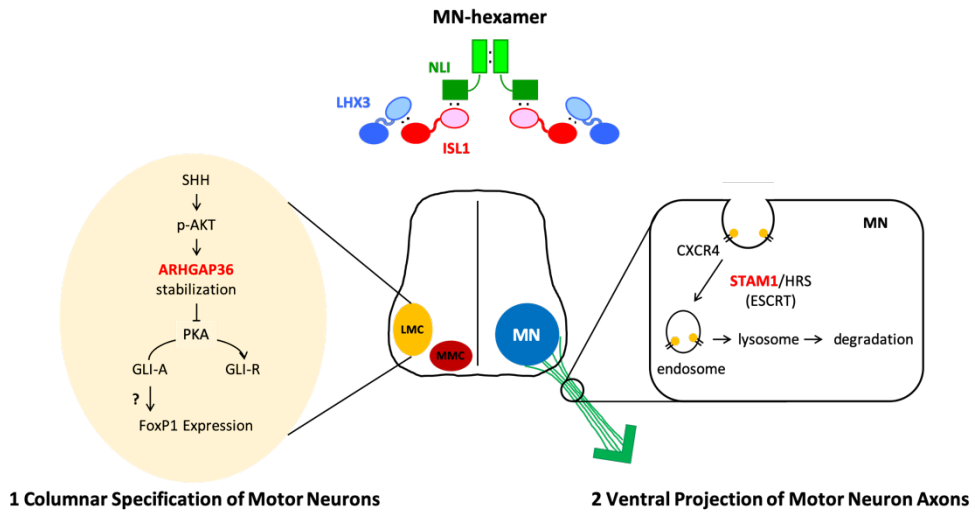


Figure 17. Proposed model of STAM1 and ARHGAP36

Schematic illustration of how STAM1 and ARHGAP36, which are Isl1-Lhx3 complex target genes, contribute to spinal cord motor neuron specification and maturation.

고찰

지금까지 척추 동물의 운동 신경 형성은 초기 발생 단계에 초점을 두고 있었다. Shh는 농도 의존적인 방식으로 dorsoventral axis를 따라 GLI 단백질의 activator와 repressor를 제어하고 그로 인해 발현되는 다양한 전사인자들이 상호 억제 작용을 통해 운동 신경의 progenitor domain 형성에 영향을 준다. Progenitor cell에서 유래한 운동 신경은 ISL1과 LHX3의 발현을 시작으로 운동 신경의 정체성을 얻게 된다. 따라서 ISL1-LHX3 complex의 표적 유전자들의 기능을 규명하는 것은 운동 신경의 본질을 이해하기 위해 중요하다. 본 연구는 운동 신경에서 ISL1-LHX3 complex에 의해 발현이 조절되는 ARHGAP36와 STAM1이 분화와 성숙에 어떻게 기여하는지 탐구했다 (Figure 17).

운동 신경 세포 성숙에서 STAM1의 역할 규명

본 연구는 STAM1은 여러 개체에서 보존되어 있는 ESCRT-0의 구성원으로써 ISL1-LHX3 complex에 의해 운동 신경에서의 발현이 조절된다는 것을 밝혔다. 또한 CXCR4가 ventral spinal cord에 위치한 운동 신경 (v-MN)을 ventral exit point까지 인도하는데 중요하다는 기존의 연구 결과

(Lieberam et al., 2005)를 토대로 운동 신경에서 endocytosis를 통해 CXCR4의 단백질 양을 조절함으로써 STAM1 또한 ventral exit point로 운동 신경의 axon을 유도 것이라는 가능성을 제안했다.

한편 spinal cord에서 STAM1과 CXCR4의 단백질 수준이 양의 상관 관계 (Figure 3E)를 갖는다는 점은 고찰이 필요한 부분이다. STAM1이 endocytosis를 통해 CXCR4의 분해를 유도한다면, STAM1의 과발현으로 인해 CXCR4의 단백질 양이 감소할 것을 예상했다. 선행 연구에 따르면 HRS를 과발현 하는 세포에서 STAM1의 발현 정도를 조절하면 endosome에 축적되어 있던 HRS가 확산되고 손상된 cargo protein들의 분해 기작이 회복됨을 통해 STAM1과 HRS의 발현 비율이 ESCRT-0 형성과 endosome을 통한 분해에 중요하다고 한다 (Kojima et al., 2014). 따라서 chick embryo의 spinal cord에 STAM1의 과발현 또한 HRS와 STAM1 사이의 비정상적인 비율로 인해 ESCRT-0 형성을 오히려 저해하고 CXCR4와 같은 cargo protein의 endosome 내 축적을 유발할 것이라고 추측할 수 있다.

CXCR4-SDF1 작용에 의해 ventral exit point에 도달한 운동 신경의 axon이 어떻게 spinal cord 밖으로 나갈 수 있는지에 대한 고찰도 필요하다. 예를 들어 기존의 연구 결과에 따르면 CXCR4-SDF1의 작용은 retinal ganglion cell axon이나 dorsal root ganglion의 감각 신경이 정상적인 궤도로 나가게 할 수 있는 repellent의 효율을 떨어뜨린다고 알려져 있다

(Chalasan et al., 2003). 따라서 v-MN의 경우, CXCR4-SDF1의 작용으로 하여금 그 근방에 존재하는 SLIT-2나 SEMAPHORN 3A의 repellent 효과를 상쇄시킴으로써 운동 신경이 ventral 방향으로 뻗어나가게 하는 요소일 것이라고 추측할 수 있다.

운동 신경 분화에서 ARHGAP36와 Shh 역할

본 연구는 Shh가 척수의 초기 발달을 조절할 뿐만 아니라 분열이 완료된 단계 (post-mitotic MN)에서 ARHGAP36 단백질의 안정화를 통해 형성되는 운동 신경 column의 세분화에 관여한다는 것을 보여줬다. 운동 신경에서 ISL1-LHX3 complex에 의해 전사가 촉진된 ARHGAP36가 그 상위 인자로 알려진 Shh, AKT와 함께 spinal cord의 LMC 신경에서 발현됨을 밝혔다. LMC 신경의 형성은 Hox 단백질 계열의 accessory protein으로 알려진 FoxP1의 발현을 통해 조절됨이 알려져 있다 (Dasen et al., 2008; Roussot et al., 2008). 따라서 Shh와 ARHGAP36가 knockout 된 mouse embryo의 spinal cord LMC에서 FoxP1의 발현이 감소함을 통해 두 인자가 LMC로의 세분화 중요할 것이라고 추측할 수 있었다.

특이한 점은 ARHGAP36가 이름에서 알 수 있듯이 Rho GTPase activating protein의 하나이지만 실제로는 GAP activity를 보이지 않는다는 점이다. 기존에 발표된 연구 결과에 따르면 ARHGAP36는 다른 GAP protein들이

GTPase activity에 사용하는 arginine finger가 부족하다고 알려져 있다. (Rittinger et al., 1997). 또한 ARHGAP36의 GAP domain으로 추정되는 부분을 mutation 시켰을 때에도 ARHGAP36에 의한 GLI activation이 유도됨을 통해 ARHGAP36의 기능이 GAP activity와 관련 없음이 밝혀진 바 있다 (Rack et al., 2014). 이는 더 나아가 ARHGAP36가 PKA의 kinase activity를 억제하는 기작 또한 Rho-ROCK signal에 의한 것이 아니라 ARHGAP36에 의해 유도된 PKA의 degradation 때문임을 보여준다 (Eccles et al., 2016). 따라서 본 연구는 ARHGAP36의 GAP 역할 보다는 Shh pathway에서의 신호 매개체로서의 기능에 초점을 맞췄다.

한편, Shh가 LMC에서 발현되도록 유도하는 요소가 무엇인지에 대한 고찰이 필요하다. ISL1이 cardiogenic mesoderm에서 Shh의 발현을 조절할 수 있다는 선행 연구가 있다 (Lin et al., 2006). 따라서 ISL1을 발현하는 LMC 신경에서, Shh를 유도할 수 있을 가능성을 살펴보면 LMC Shh의 근원을 알 수 있을 거라고 생각한다.

기존의 연구들은 Hox 단백질 계열의 cofactor로 알려진 Pbx가 Hox 의존적 혹은 독립적인 방식으로 운동 신경 column을 조직하는데 결정적인 요소로 작용함을 밝혔다 (Golonzhka et al., 2015; Hanley et al., 2016). Pbx knockout은 FoxP1을 발현하는 LMC 신경의 돌연변이를 초래하고 FoxP1이나 Hox 단백질 계열의 손실로 인한 기형과는 다른 방식으로 MMC 및

HMC 사이의 구분에 실패하였다. 이를 통해 Pbx의 표적 유전자를 밝혀냈고, Pbx의 결실로 인해 전사가 저하된 인자 중 하나가 ARHGAP36였다. 이것은 ARHGAP36가 FoxP1이 발현되는 LMC 신경을 유지하는 데 중요한 요소라는 또 다른 증거임과 동시에 ARHGAP36의 전사가 ISL1-LHX3 complex에 의해 조절되는 것과 Pbx/Hox에 의해 조절되는 것이 어떻게 다른지에 대한 후속 연구가 필요함을 제시한다. ARHGAP36의 전사가 ISL1-LHX3 complex에 의해 조절되지만 실제로 운동 신경에서 ISL1과 LHX3가 발현되어 있는 MMC에는 ARHGAP36가 발현되어 있지 않다는 점을 생각해보면, Pbx/Hox와 ISL1-LHX3 complex 사이에 연관성이 있음을 추측할 수 있다.

Embryo spinal cord 내에서 ARHGAP36 발현 양상을 살펴본 결과, ARHGAP36가 thoracic의 PGC나 lumbar에서도 약하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 ARHGAP36가 knockout 된 embryo의 spinal cord에서 보여지는 FoxP1을 발현하는 cell 수의 감소는 brachial level의 LMC에서만 관찰되고 thoracic이나 lumbar에서는 확인되지 않았다. HoxA/C 단백질 계열의 결핍은 lumbar LMC가 아닌 brachial LMC의 기형을 유발한다는 것이 알려져 있다 (Sanguinetto et al., 2008). Hox6 단백질은 brachial에서 LMC 신경 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Dasen et al., 2003; Dasen et al., 2005). 운동 신경이 다양성을 얻는 과정에서 보다 정교한 조절을 위

해, Hox6가 발현되는 brachial level은 Hox5가 존재하는 rostral 쪽 LMC와 Hox8이 존재하는 caudal 쪽 LMC로 세분화 될 수 있다. Hox5와 Hox8은 cross-repressive 한 방식으로 상호 작용하여 brachial level에서 운동 신경 pool의 패턴을 조정한다. Rostral brachial LMC는 RUNX1을 발현하는 세포 집단을 구성하며, 이는 scapulohumeralis posterior (Sca)를 자극한다 (Sanguinetto et al., 2008). 이처럼 Arhgap36가 삭제된 embryo spinal cord에서 특정 영역의 FoxP1만이 감소 된다는 점과 ARHGAP36의 제한된 발현은 ARHGAP36가 팔과 다리를 구분 짓는 운동 신경 pool의 다양화에 기여할 수 있는 가능성을 제시한다.

또한 운동 신경이 ARHGAP35 (또는 p190RhoGAP)에 의해 환경 의존적으로 DCC-Netrin 신호에 반응성을 보인다 것과 ARHGAP35가 삭제된 배아의 척수에서 LMC1 신경의 축삭 돌기가 궤도를 벗어난다는 선행 연구 결과 (Bonanomi et al., 2019)를 토대로 ARHGAP35와 ARHGAP36 사이의 연관성에 대해 고찰해 볼 필요가 있다.

본 연구에서 제작한 Arhgap36 knockout mouse는 general knockout model이라는 점과 ARHGAP36가 PKA의 kinase activity를 억제한다는 점에도 불구하고 lethality를 보이지 않는다. ARHGAP36의 발현 양상을 살펴보면 mouse E13.5까지 spinal cord의 운동 신경에 제한되어 발현된다는 점을 발견할 수 있다. 따라서 ARHGAP36 knockout 성체 mouse에는 큰 영향을 미

치지 않을 수 있음을 추측할 수 있다. 하지만 PKA activity가 실제로 mouse embryo의 spinal cord 안에서도 억제되는지 알아보기 위해서 대조군과 knockout embryo의 spinal cord를 추출한 후, PKA의 kinase activity에 의해 영향을 받는 GLI3 repressor form 또는 GLI1 단백질 양의 변화를 관찰해보면 흥미로울 것 같다.

앞서 언급했듯이, ARHGAP36는 PKA의 유비퀴틴화를 촉진시킴으로써 PKA가 ESCRT-0를 통해 분해된다는 내용이 밝혀진 바 있다 (Eccles et al., 2016). 이는 본 연구에서 밝힌 것과 별개로 STAM1이 운동 신경에서 더 많은 단계에 개입하고 있음을 시사한다. STAM1은 ARHGAP36가 발현되는 LMC 신경의 세분화 뿐만 아니라 LMC 신경이 ventral exit point를 찾을 때 ventral trajectory로 유인하는 억제제의 작용을 약화 시킴으로써 (Chalasani et al., 2003) LMC 신경의 분화와 성숙 전반적인 과정에 기여할 수 있음을 보여준다.

참고문헌

- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T. M., & Sockanathan, S. (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron*, 23(4), 659-674.
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12513-12521.
- Bonanomi, D., Valenza, F., Chivatakarn, O., Sternfeld, M. J., Driscoll, S. P., Aslanian, A., . . . Lewcock, J. W. (2019). p190RhoGAP Filters Competing Signals to Resolve Axon Guidance Conflicts. *Neuron*.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T., Rubenstein, J., & Ericson, J. (1999). Homeobox gene Nkx2. 2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature*, 398(6728), 622.
- Briscoe, J., & Thérond, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(7), 416.
- Chalasani, S. H., Sabelko, K. A., Sunshine, M. J., Littman, D. R., & Raper, J. A. (2003). A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *Journal of Neuroscience*, 23(4), 1360-1371.
- Dasen, J. S., De Camilli, A., Wang, B., Tucker, P. W., & Jessell, T. M. (2008). Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. *Cell*, 134(2), 304-316.
- Dasen, J. S., & Jessell, T. M. (2009). Chapter Six Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Current topics in developmental biology*, 88, 169-200.
- Dasen, J. S., Liu, J.-P., & Jessell, T. M. (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature*, 425(6961), 926.
- Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S., & Jessell, T. M. (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell*, 123(3), 477-491.
- Davis-Dusenbery, B. N., Williams, L. A., Klim, J. R., & Eggan, K. (2014). How to make spinal motor neurons. *Development*, 141(3), 491-501.

- Dessaud, E., McMahon, A. P., & Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*, 135(15), 2489-2503.
- Eccles, R. L., Czajkowski, M. T., Barth, C., Müller, P. M., McShane, E., Grunwald, S., . . . Zühlke, K. (2016). Bimodal antagonism of PKA signalling by ARHGAP36. *Nature communications*, 7, 12963.
- Endo, K., Takeshita, T., Kasai, H., Sasaki, Y., Tanaka, N., Asao, H., . . . O'Shea, J. J. (2000). STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases. *FEBS letters*, 477(1-2), 55-61.
- Golonzhka, O., Nord, A., Tang, P. L., Lindtner, S., Ypsilanti, A. R., Ferretti, E., . . . Rubenstein, J. L. (2015). Pbx regulates patterning of the cerebral cortex in progenitors and postmitotic neurons. *Neuron*, 88(6), 1192-1207.
- Guthrie, S., & Lumsden, A. (1992). Motor neuron pathfinding following rhombomere reversals in the chick embryo hindbrain. *Development*, 114(3), 663-673.
- Hanley, O., Zewdu, R., Cohen, L. J., Jung, H., Lacombe, J., Philippidou, P., . . . Dasen, J. S. (2016). Parallel Pbx-dependent pathways govern the coalescence and fate of motor columns. *Neuron*, 91(5), 1005-1020.
- Humke, E. W., Dorn, K. V., Milenkovic, L., Scott, M. P., & Rohatgi, R. (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & development*, 24(7), 670-682.
- Jacob, J., & Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO reports*, 4(8), 761-765.
- Kennedy, J. E., & Marchese, A. (2015). Regulation of GPCR trafficking by ubiquitin *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 132, pp. 15-38): Elsevier.
- Kojima, K., Amano, Y., Yoshino, K., Tanaka, N., Sugamura, K., & Takeshita, T. (2014). ESCRT-0 protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) is targeted to endosomes independently of signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the complex formation with STAM promotes its endosomal dissociation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(48), 33296-33310.
- Lee, S.-K., Lee, B., Ruiz, E. C., & Pfaff, S. L. (2005). Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes & development*, 19(2), 282-294.

- Lee, S.-K., & Pfaff, S. L. (2003). Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron*, 38(5), 731-745.
- Lee, S., Cuvillier, J. M., Lee, B., Shen, R., Lee, J. W., & Lee, S.-K. (2012). Fusion protein Isl1-Lhx3 specifies motor neuron fate by inducing motor neuron genes and concomitantly suppressing the interneuron programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), 3383-3388.
- Lee, S., Lee, B., Joshi, K., Pfaff, S. L., Lee, J. W., & Lee, S.-K. (2008). A regulatory network to segregate the identity of neuronal subtypes. *Developmental cell*, 14(6), 877-889.
- Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J., & Jessell, T. M. (2005). A Cxcl12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron*, 47(5), 667-679.
- Liem Jr, K. F., Tremml, G., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*, 82(6), 969-979.
- Lin, L., Bu, L., Cai, C.-L., Zhang, X., & Evans, S. (2006). Isl1 is upstream of sonic hedgehog in a pathway required for cardiac morphogenesis. *Developmental biology*, 295(2), 756-763.
- Liu, J.-P., Laufer, E., & Jessell, T. M. (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron*, 32(6), 997-1012.
- Ma, Y.-C., Song, M.-R., Park, J. P., Ho, H.-Y. H., Hu, L., Kurtev, M. V., . . . Greenberg, M. E. (2008). Regulation of motor neuron specification by phosphorylation of neurogenin 2. *Neuron*, 58(1), 65-77.
- Malik, R., & Marchese, A. (2010). Arrestin-2 interacts with the endosomal sorting complex required for transport machinery to modulate endosomal sorting of CXCR4. *Molecular biology of the cell*, 21(14), 2529-2541.
- Martí, E., & Bovolenta, P. (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in neurosciences*, 25(2), 89-96.
- Martí, E., Takada, R., Bumcrot, D. A., Sasaki, H., & McMahon, A. P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development*, 121(8), 2537-2547.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Okamoto, A., Kitamura, N., & Komada, M. (2004). Association

- with Hrs is required for the early endosomal localization, stability, and function of STAM. *The Journal of Biochemistry*, 135(3), 385-396.
- Niewiadomski, P., Kong, J. H., Ahrends, R., Ma, Y., Humke, E. W., Khan, S., . . . Rohatgi, R. (2014). Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell reports*, 6(1), 168-181.
- Novitsch, B. G., Chen, A. I., & Jessell, T. M. (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron*, 31(5), 773-789.
- Oppenheim, R. W., Homma, S., Marti, E., Prevette, D., Wang, S., Yaginuma, H., & McMahon, A. P. (1999). Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by sonic hedgehog. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 13(5), 348-361.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T., & Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell*, 84(2), 309-320.
- Rack, P. G., Ni, J., Payumo, A. Y., Nguyen, V., Crapster, J. A., Hovestadt, V., . . . Firestone, A. J. (2014). Arhgap36-dependent activation of Gli transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), 11061-11066.
- Rayala, S. K., den Hollander, P., Balasenthil, S., Molli, P. R., Bean, A. J., Vadlamudi, R. K., . . . Kumar, R. (2006). Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) interacts with PELP1 and activates MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4395-4403.
- Riobó, N. A., Lu, K., Ai, X., Haines, G. M., & Emerson, C. P. (2006). Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4505-4510.
- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., . . . Smerdon, S. J. (1997). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, 388(6643), 693.
- Rousso, D. L., Gaber, Z. B., Wellik, D., Morrissey, E. E., & Novitsch, B. G. (2008). Coordinated actions of the forkhead protein Foxp1 and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons. *Neuron*, 59(2), 226-240.
- Sanguinetto, S. A. D. T., Dasen, J. S., & Arber, S. (2008). Transcriptional mechanisms controlling motor neuron diversity and connectivity. *Current opinion in*

- neurobiology*, 18(1), 36-43.
- Schmidt, O., & Teis, D. (2012). The ESCRT machinery. *Current Biology*, 22(4), R116-R120.
- Sharma, K., Sheng, H. Z., Lettieri, K., Li, H., Karavanov, A., Potter, S., . . . Pfaff, S. L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell*, 95(6), 817-828.
- Shirasaki, R., & Pfaff, S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annual review of neuroscience*, 25(1), 251-281.
- Song, M.-R., Shirasaki, R., Cai, C.-L., Ruiz, E. C., Evans, S. M., Lee, S.-K., & Pfaff, S. L. (2006). T-Box transcription factor Tbx20 regulates a genetic program for cranial motor neuron cell body migration. *Development*, 133(24), 4945-4955.
- Song, M.-R., Sun, Y., Bryson, A., Gill, G. N., Evans, S. M., & Pfaff, S. L. (2009). Islet-to-LMO stoichiometries control the function of transcription complexes that specify motor neuron and V2a interneuron identity. *Development*, 136(17), 2923-2932.
- Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neurons diversity. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 293.
- Tanabe, Y., & Jessell, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*, 274(5290), 1115-1123.
- Thaler, J. P., Koo, S. J., Kania, A., Lettieri, K., Andrews, S., Cox, C., . . . Pfaff, S. L. (2004). A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron*, 41(3), 337-350.
- Thaler, J. P., Lee, S.-K., Jurata, L. W., Gill, G. N., & Pfaff, S. L. (2002). LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell*, 110(2), 237-249.
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., . . . Ericson, J. (2001). Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron*, 31(5), 743-755.
- Varjosalo, M., & Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development*, 22(18), 2454-2472.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7), 489.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., & Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 110(3), 385-397.
- Zeng, X., Goetz, J. A., Suber, L. M., Scott Jr, W. J., Schreiner, C. M., & Robbins, D. J. (2001).

A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, 411(6838), 716.

Abstract

Molecular Mechanisms of Isl1-Lhx3 Complex Target Genes in Spinal Motor Neuron Development

Heejin Nam

Department of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

The movement of various muscles, such as grasping or walking, is accomplished via a well-organized system where the axons of motor neurons from central nervous system (CNS) stimulate various target muscles. Each motor neuron acquires diversity through the combination of various transcription factors during embryo development. Sonic hedgehog (Shh) secreted from the floor plate at the early developmental stage of the spinal cord generates a concentration gradient along the dorsoventral axis of the spinal cord and contributes to the progenitor domain

formation of the ventral neural tube.

During this process, motor neurons are derived from the motor neuron progenitor (pMN). The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, Olig2, which is expressed in pMN, induces the expression of ISL1 and LHX3 in the final mitosis of pMN. Comprised of these two factors, the ISL1-LHX3 complex recognizes the hexamer response element (HxRE) of the genes related to giving identities to the motor neurons and is involved in the transcriptional regulation of these genes. Among number of target gene candidates, this study investigates the role of STAM1 and ARHGAP36 in motor neuron specification and maturation.

Studies have shown that STAM1 participates in endocytosis and, together with HRS, forms an endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT-0) complex, which is essential in generating multivesicular bodies and cytokinesis. This research reveals that the ISL1-LHX3 complex binds to the enhancer of STAM1 and directly regulates the expression of STAM1, specifically in the motor neurons of the spinal cord. CXCR4, which is recognized by ESCRT-0, is known to be important for axons to reach the ventral exit point of the spinal cord and project their branches to the targeted muscle during motor neuron development. In the spinal cord motor neurons of chick embryo, CXCR4, a target protein of ESCRT-0, is also expressed along with STAM1 and HRS, and there exists an interaction between them. When STAM1 is specifically knocked down in the chick spinal cord, CXCR4 protein level shows positive correlation with STAM1. This results in motor neurons to fail in finding the ventral exit point and project their axons to dorsal spinal cord. Similarly,

overexpression of STAM1 or CXCR4 shows similar phenotypes. Based on the above results, this study shows that STAM1, the one of the target genes of the ISL1-LHX3 complex, is vital in maintaining the proper amount of CXCR4 and leads motor neurons to exit the spinal cord through the correct exit point.

Another target gene, ARHGAP36, also shows that ISL1-LHX3 binds to the HxRE present in the enhancer region to regulate the transcription of the gene. ARHGAP36 is expressed only in the motor neurons in the spinal cord and more specifically, in the lateral motor column (LMC). Previous studies have shown that ARHGAP36 is known to mediate Shh signaling as a downstream factor of the Shh pathway, but the importance of ARHGAP36 and Shh signaling in postmitotic motor neurons is not well known. The Shh or Arhgap36 knockout mouse model failed to maintain the normal levels of LMC and overexpression of ARHGAP36 in chick embryo spinal cord showed an increase in LMC motor nerve. Also, AKT, a positive regulator of the Shh pathway, increases ARHGAP36 protein stability by inducing phosphorylation of ARHGAP36. As consequence, ARHGAP36 mediates Shh signal by inhibiting the kinase activity of PKA, a negative regulator in Shh pathway. This study shows that Shh-AKT signaling in LMC is capable of increasing the protein stability of ARHGAP36, whose expression is regulated by ISL1-LHX3 complex, and is an essential factor in maintaining LMC motor neurons.

In summary, STAM1 and ARHGAP36, which are the target genes of the ISL1-LHX3 complex, contribute to the specification and maturation of motor neurons, thereby indicating that they are important factors that give common characteristics

to the motor neurons while generating diversity in each of them.

Keywords: Spinal Motor Neurons, ISL1-LHX3 complex, STAM1, ARHGAP36, axon projection, LMC

Student Number: 2013-21586